



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**



## **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO SIMULTÂNEA DE  
XILITOL E ETANOL A PARTIR DO BAGAÇO DE SISAL**

**GUSTAVO SANTOS BEZERRA**



**João Pessoa – PB**

**Agosto / 2016**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**



## **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

### **AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO SIMULTÂNEA DE XILITOL E ETANOL A PARTIR DO BAGAÇO DE SISAL**

**GUSTAVO SANTOS BEZERRA\***

Dissertação apresentada como requisito para  
obtenção do título de Mestre em Química  
pela Universidade Federal da Paraíba

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Marta Maria da Conceição

\*Bolsista CAPES

**João Pessoa – PB**

**Agosto / 2016**

**B 574a** Bezerra, Gustavo Santos.

Avaliação da produção simultânea de xilitol e etanol a partir do bagaço de sisal / Gustavo Santos Bezerra. João Pessoa, 2016.

80f. : il.

Orientadora: Marta Maria da Conceição  
Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCEN

1. Química. 2. Etanol. 3. Xilitol. 4. Bagaço de sisal.

UFPB/BC

CDU 54(043)

# **Avaliação da produção simultânea de xilitol e etanol a partir do bagaço de sisal.**

Dissertação de Mestrado apresentada pelo aluno Gustavo Santos Bezerra e aprovada pela banca examinadora em 29 de agosto de 2016.



---

Profª. Drª. Marta Maria da Conceição  
Orientadora/Presidente



---

Profª. Drª. Sharline Florentino de Melo Santos  
Examinadora



---

Profª. Drª. Antonia Lúcia de Souza  
Examinadora

## **Agradecimentos**

Agradeço,

À Deus, pelo seu infinito amor, misericórdia, e graças que tem me proporcionado.

Aos meus familiares, em especial meus pais (Luzinete e Jeoval), meu irmão (Daniel), minhas tias e meus primos pela paciência, confiança e incentivo que sempre me deram durante toda vida. À minha namorada Ana Paula, pela confiança e incentivo diariamente, mesmo distante.

Ao meu grande amigo Franklin Damião, que vem comigo nessa jornada desde tempos de graduação, e durante esse período de dois anos de mestrado foi essencial para a conclusão desse trabalho, não sendo somente um irmão de laboratório, mas um irmão que tive o prazer ganhar em vida.

Aos colegas de iniciação científica que sempre estiveram dispostos a ajudar durante todo o trabalho: Georges, Rutchelly, Lucas, Wyllian, Isabela e Isis. Aos amigos do laboratório: Josevan, Renata, Bruna, Leanderson e Aleir.

Aos técnicos Rafael e Débora por sempre estarem disponíveis, pela paciência além do excelente convívio a cada dia, firmando assim uma amizade. Sem as disponibilidades de ambos não seria possível a conclusão do trabalho. Agradeço imensamente a grandes colegas pesquisadores que conquistei e que contribuíram efetivamente no decorrer do meu trabalho: Lorena Lucena, Clébson Sidney, Aline, Claudia, Elissandro e Douglas.

Aos professores Flávio Honorato, Sharline F. de Melo e Líbia Conrado, que abriram as portas dos seus laboratórios para realização do trabalho, além das suas disponibilidades para tirar dúvidas sobre assuntos e fazer sugestões importantes.

A minha orientadora, Marta Conceição, pela paciência durante esses dois anos, disponibilidade e pela presença em todos os momentos da pesquisa.

Aos componentes da banca de qualificação e defesa José Rodrigues, Antônia Lúcia e Sharline.

Aos meus amigos de grupo de oração (UNIDOS NA FÉ) por me acolher em João Pessoa, e serem como uma família que ganhei nessa cidade.

Aos laboratórios: LACOM - UFPB, Laboratório de bioengenharia – UFPB, Laboratório de operações unitárias - UFPB, Laboratório de análises Físico-químicas – UFPB e LEB – UFCG

A UFPB e Capes pelo apoio financeiro.

## Resumo

A comunidade científica tem se preocupado com problemas ambientais e a destinação de resíduos agroindustriais, buscando realizar tratamentos para os resíduos ou reaproveitamento para agregar valor. O bagaço de sisal é um resíduo do desfibramento do sisal, que é descartado no meio ambiente sem controle. O objetivo desse trabalho foi avaliar a produção simultânea de xilitol e etanol a partir do licor hemicelulósico do bagaço de sisal. A caracterização da biomassa lignocelulósica foi realizada, verificando os teores de celulose, hemicelulose e lignina. O pré-tratamento foi realizado em reator de aço inoxidável na razão 1/10 (bagaço/ácido) durante 1 hora. Para verificar a influência das variáveis temperatura e concentração de ácido sulfúrico um planejamento experimental  $2^2$  com 3 pontos centrais foi realizado. O licor do hidrolisado hemicelulósico foi analisado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) quanto aos teores de açúcares e inibidores e as alterações no bagaço tratado foram analisadas por Difração de Raios-X (DRX), microscopia eletrônica de varredura (MEV), Termogravimetria (TG) e Infravermelho (IV). No tratamento ácido o modelo foi estatisticamente significativo no nível de confiança de 95%, confirmado pelo teste F, a superfície de resposta indicou que os maiores teores de xilose e glicose foram obtidos nos níveis máximos, que correspondem a temperatura de 120 °C e 2,5% de ácido sulfúrico. As técnicas de caracterização reafirmaram a remoção da fração hemicelulósica do material lignocelulósico. No Infravermelho verificou-se modificações nas bandas de absorção referentes a hemicelulose devido a sua remoção, e modificação nas bandas da lignina e celulose devido seu aumento. A curva termogravimétrica assumiu característica semelhante a da celulose pós-tratamento ácido, devido ser o componente em maior quantidade na biomassa. As micrografias demonstraram a quebra das regiões fibrosas da celulose e diminuição das fibrilas que as interligavam, sendo essas a hemicelulose. Na difração de raios X o índice de cristalinidade indicou grande remoção da fração amorfa do material lignocelulósico. Na fermentação foi realizado o estudo do microrganismo a ser utilizado, verificou-se o melhor tempo para realização do inóculo, nas condições em que o meio contivesse 3g/L ou  $10^7$  células, e observaram-se três das principais fases do crescimento do microrganismo. Tanto pela análise de massa seca quanto pela contagem de células por câmara de *Neubauer* o melhor tempo para a realização da fermentação foi entre 24 e 36 h. Verificou-se que os melhores tempos de fermentação para o xilitol foi 72 h e para o etanol foi 36 h, produzindo respectivamente 1,4 g/L e 2,4 g/L com a levedura *Cândida guilliermondii*.

**Palavras chaves:** Etanol; xilitol; bagaço de sisal.

## Abstract

The scientific community has been concerned with environmental issues and the allocation of agro-industrial waste, seeking to perform treatments for waste or recycling to add value. Sisal bagasse is a residue of the sisal, which is discarded into the environment without control. The aim of this study was to evaluate the simultaneous production of xylitol and ethanol from hemicellulose liquor sisal bagasse. The characterization of lignocellulosic biomass was carried out by checking the cellulose, hemicellulose and lignin. The pretreatment was carried out in stainless steel reactor in the ratio 1/10 (bagasse / acid) for 1 hour. To check the influence of temperature variables and concentration of sulfuric acid  $2^2$  experimental design with 3 central points was carried out. The liquor hemicellulose hydrolyzate was analyzed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) methods as the levels of sugars and inhibitors and the changes in the treated bagasse were analyzed-Ray Diffraction (XRD), scanning electron microscopy (SEM), thermogravimetry (TG) and Infrared (IR). In the acid treatment model was statistically significant at the 95% confidence level, confirmed by the F test, the response surface indicated that the higher xylose content and glucose were obtained at the maximum level, corresponding to a temperature of 120 °C and 2.5% sulfuric acid. The characterization techniques reaffirmed the removal of the hemicellulose fraction of lignocellulosic material. Infrared there are changes in the absorption bands relating hemicellulose due to its removal, and modification of the lignin and cellulose bands due their increase. The thermogravimetric curve taken characteristic similar to the aftertreatment acid cellulose, as this is the component in larger amounts in the biomass. The micrographs showed the breakdown of fibrous regions of the cellulose fibrils and decrease in the interconnected, and these hemicellulose. In the XRD crystallinity index indicated extensive removal of the amorphous fraction of the lignocellulosic material. In the fermentation was carried out the study of the microorganism to be used, it is the best time to perform the inoculum, under the conditions that the medium contained 3 g/L or  $10^7$  cells and were observed three main stages of growth of the microorganism. Both the dry mass analysis as the cell count per chamber Neubauer the best time for completion of the fermentation was between 24 and 36 h. It was found that the best fermentation times for xylitol was 72 h and the ethanol was 36 h, yielding respectively 1.4 g/L and 2.4 g/L in *Candida guilliermondii*.

**Key words:** Ethanol; xylitol; sisal bagasse.

## Lista de equações

$$TU\% = \frac{(MRAU - MRAS) \times 100\%}{MAU} \quad \text{Equação 1.}$$

$$TC\% = \frac{(MRAC - MR) \times 100\%}{MA} \quad \text{Equação 2.}$$

$$TE\% = \frac{(MRE - MRRS) \times 100}{MA} \quad \text{Equação 3.}$$

$$TL\% = \frac{(MFL - MF) \times 100}{MA} \quad \text{Equação 4.}$$

$$TH\% = \frac{(MFH - MF) \times 100}{MA} \quad \text{Equação 5.}$$

$$TA\% = \frac{(MFA - MF) \times 100}{MA} \quad \text{Equação 6.}$$

$$TeM\% = TH\% - TA\% \quad \text{Equação 7.}$$

$$I_c = \left[ \frac{I_c - I_a}{I_c} \right] * 100 \quad \text{Equação 8.}$$

$$\text{Quantidade de células/mL} = (\sum 5 \text{ quadrados}) \times (5 \times 10^4) \times \text{diluição} \quad \text{Equação 9.}$$

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{(P_f - P_i)}{(S_i - S_f)} \quad \text{Equação 10}$$

$$E(\%) = \left( \frac{Y_{P/S} \text{ experimental}}{Y_{P/S} \text{ teórico}} \right) * 100 \quad \text{Equação 11}$$



## Lista de abreviações

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística	IBGE
Difração de raios-X	DRX
Infravermelho	IV
Termogravimétrica	TG
Microscopia eletrônica de varredura	MEV
Yeast-Malte Extract Agar	YMA
Índice de cristalinidade	IC
Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídio	NADH
Xilose redutase	XR
xilitol desidrogenase	XDR
xiluloquinase	XQ
Hidroximetilfurfural	HMF
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária	EMBRAPA
Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	CLAE

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1:</b> Matriz do planejamento experimental $2^2$ e variáveis de entrada. ....	37
<b>Tabela 2:</b> Reagentes usados no meio de cultura .....	38
<b>Tabela 3:</b> Reagentes e quantidades usadas no meio de crescimento (SILVA, 2013). ....	39
<b>Tabela 4:</b> Composição lignocelulósica do bagaço de sisal, bagaço do agave azul (Vandenbossche et al 2014), bagaço de cana (Mesa et al, 2010), palha de cana (Pereira et al 2015) e algodão (Morais et al, 2013). ....	45
<b>Tabela 5:</b> Teores de açúcares e inibidores produzidos no pré-tratamento experimental nas concentrações de ácido (TA) e temperatura (T); ( - ) ponto mínimo, (+) ponto máximo, (0) ponto central. ....	47
<b>Tabela 6:</b> Determinação do teste F.....	49
<b>Tabela 7:</b> Teores de açúcares e inibidores na melhor condição do pré-tratamento.....	50
<b>Tabela 8:</b> Principais modificações no infravermelho do material in natura e pós-tratamento....	52
<b>Tabela 9:</b> Comparação do IC do material in natura e pós tratamento de variadas biomassas ....	54

## Lista de figuras

<b>Figura 1</b> – Processamento da fibra do sisal e geração de resíduos .....	19
<b>Figura 2:</b> Composição das folhas sisal com relação a fibra, bagaço e resíduos líquidos. ....	20
<b>Figura 3</b> – Composição dos materiais lignocelulósicos .....	20
<b>Figura 4</b> – Composição de materiais lignocelulósicos e subprodutos gerados .....	21
<b>Figura 5</b> – Fórmula estrutural da celulose. ....	22
<b>Figura 6</b> – Principais açúcares solubilizados a partir da fração hemicelulósica. ....	23
<b>Figura 7</b> –Álcoois precursores da formação da lignina.....	24
<b>Figura 8:</b> Conversão de xilose a xilitol (reação de hidrogenação).....	25
<b>Figura 9:</b> Propriedades químicas e físicas do xilitol. ....	26
<b>Figura 10:</b> Fluxograma representativo das etapas de produção de etanol a partir da xilose e glicose. ....	27
<b>Figura 11:</b> Fluxograma representativo das etapas executadas na pesquisa. ....	29
<b>Figura 12:</b> Processamento do sisal e geração de resíduos sólidos. ....	30
<b>Figura 13:</b> Determinação do teor de umidade no bagaço de sisal .....	31
<b>Figura 14:</b> A - Carbonização do bagaço de sisal; B - Cinzas do bagaço de sisal. ....	32
<b>Figura 15:</b> A - Sistema de soxhlet usado para remoção de extrativos; B - Extrativos totalmente solubilizados na solução extratora. ....	33
<b>Figura 16:</b> A - Repouso de 24 horas da biomassa em contato com ácido sulfúrico 72%; B – Aquecimento no sistema de soxhlet; C - Floculação das partículas de lignina. ....	34
<b>Figura 17:</b> Sistema de Banho Maria para a obtenção de holocelulose.....	35
<b>Figura 18:</b> Holocelulose em contato com uma solução de hidróxido de sódio para determinação da alfa-celulose. ....	35
<b>Figura 19:</b> Repicagem. ....	39
<b>Figura 20</b> – Contagem de células por Câmara de Neubauer .....	40
<b>Figura 21:</b> Composição lignocelulósica do bagaço de sisal. ....	44
<b>Figura 22:</b> Componentes lignocelulósicos do bagaço de sisal in natura e pós tratamento ácido.....	46
<b>Figura 23:</b> Superfície resposta da xilose em relação a temperatura e teor de ácido.....	48
<b>Figura 24</b> -Diagrama de Pareto para produção de xilose. ....	49
<b>Figura 25:</b> Concentração do licor para remoção de inibidores fermentativos. ....	50
<b>Figura 26:</b> Infravermelho do bagaço de sisal in natura e pós tratamento ácido.....	51
<b>Figura 27</b> - Difração de raios-X do bagaço tratado (BT) e do bagaço in natura (BN). ....	53
<b>Figura 28</b> -Micrografias do bagaço de sisal in natura (primeira coluna) e pós tratamento ácido (segunda coluna). ....	55
<b>Figura 29:</b> A- Curvas TG do bagaço de sisal in natura e B- Após pré-tratamento ácido.....	56
<b>Figura 30:</b> Curvas TG do bagaço de sisal antes e após pré-tratamento, e dos constituintes (Lignina, holocelulose e alfa-celulose). ....	57
<b>Figura 31:</b> Curvas de crescimento por número de células (A) e massa seca (B). ....	58
<b>Figura 32:</b> Curvas de crescimento por massa seca (A) e número de células (B). ....	59
<b>Figura 33:</b> A- Consumo de xilose e produção de xilitol; B- Crescimento do microrganismo no licor hemicelulósico. ....	60
<b>Figura 34:</b> Produção do etanol a partir da xilose. XR – xiloserredutase; XDR – xilitol desidrogenase; XQ - xiluloquinase. ....	62

# Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>18</b>
2.1 Resíduos agroindustriais .....	18
2.2 Geração de resíduos no processamento de sisal .....	18
2.3 Biomassa lignocelulósica.....	20
2.4 Celulose .....	22
2.5 Hemicelulose .....	22
2.6 Lignina .....	24
2.7 Xilitol.....	25
2.8 Etanol.....	26
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
3.1 Aquisição do bagaço do sisal e pré-tratamento físico .....	30
3.2 Caracterização lignocelulósica .....	31
3.2.1 Umidade .....	31
3.2.2 Cinzas.....	32
3.2.3 Extrativos .....	32
3.2.4 Lignina .....	33
3.2.5 Holocelulose .....	34
3.2.6 Alfa-celulose.....	35
3.3 Caracterização físico-química .....	36
3.3.1 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho .....	36
3.3.2 Difração de raios-X.....	36
3.3.3 Análises Termogravimétricas .....	37
3.3.4 Análises de Microscopia Eletrônica de Varredura.....	37
3.5 Pré-tratamento.....	37
3.6 Estudo do microrganismo.....	38
3.6.1 Repicagem .....	38
3.6.2 Pré-inóculo e crescimento da levedura.....	39
3.6.3 Fermentação .....	41
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>44</b>
4.1 Composição lignocelulósica .....	44
4.2 Pré-tratamento.....	47

<b>4.3</b>	<b>Caracterização físico-química .....</b>	<b>51</b>
4.3.1	Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho .....	51
4.3.2	Difração de raios –X .....	52
4.3.3	Microscopia eletrônica de varredura .....	54
4.3.4	Estudo Termogravimétrico .....	56
<b>4.4</b>	<b>Cinética de crescimento e produção de xilitol e etanol .....</b>	<b>58</b>
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>65</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>66</b>
	<b>APÊNDICE .....</b>	<b>77</b>

# **1- INTRODUÇÃO**

## 1. INTRODUÇÃO

O destino de resíduos agroindustriais e os problemas ambientais gerados pelo seu descarte inadequado é uma preocupação mundial. Desta forma busca-se o aproveitamento dos resíduos lignocelulósicos.

O sisal (*Agave sisalana*) é uma planta que tem origem no México, sendo o Brasil o maior produtor e exportador de fibra de sisal (SANTOS et al., 2015). No processamento da fibra de sisal são gerados resíduos sólidos, sendo denominado bagaço de sisal, que é descartado no meio ambiente sem controle, o que pode ocasionar problemas ambientais, assim como perda do potencial energético devido o material ser rico em celulose e hemicelulose.

A maioria dos estudos de conversão de biomassa lignocelulósica em etanol ou xilitol tem como matéria prima o bagaço da cana-de-açúcar, sendo tal resíduo mais produzido no Brasil anualmente, enquanto estudos acerca dos resíduos gerados a partir do processamento do sisal ainda são poucos. Anualmente no Brasil gera-se aproximadamente 552 mil toneladas de bagaço de sisal, sendo esse percentual todo concentrado na região nordeste (IBGE, 2016).

Para utilização desse material como fonte energética é necessário realizar pré-tratamentos, sendo geralmente ácidos ou básicos, os quais buscam deixar a celulose mais exposta, facilitando assim uma posterior solubilização dos açúcares. Nos pré-tratamentos ocorre a extração de alguns açúcares, que podem ser convertidos em co-produtos de interesse científico. Dentre esses açúcares destaca-se a xilose, que é uma pentose originada da fração hemicelulósica da biomassa que pode ser convertida a xilitol e etanol a partir do processo de fermentação.

O etanol de segunda geração produzido a partir da biomassa lignocelulósica é uma solução para a sustentabilidade energética, mas ainda apresenta custos elevados. Esse processo pode ser simplificado o que pode torná-lo vantajoso.

Neste sentido ressaltasse a importância da produção simultânea de xilitol e etanol a partir da fração hemicelulósica do bagaço de sisal para obter dois produtos de grande interesse, um pela indústria energética e o outro pela indústria alimentícia e farmacêutica, com redução de etapas, que resulta em menor gasto de reagentes e energia.

## 1.1 Objetivos

O trabalho teve como objetivo geral avaliar a produção simultânea de xilitol e etanol a partir do bagaço de sisal. E mais especificamente:

- Caracterizar a biomassa lignocelulósica antes e depois do pré-tratamento com ácido diluído;
- Realizar planejamento experimental, verificando as melhores condições de concentração de ácido e temperatura;
- Caracterizar através de técnicas físico-químicas (DRX, IV, TG e MEV) o bagaço de sisal antes e depois do tratamento ácido;
- Fazer estudo da cinética do cultivo com a levedura *Cândida guilliermondii* CCT 1516 para verificar o melhor tempo de fermentação;
- Remover os inibidores do processo fermentativo;
- Determinar os teores de xilitol e etanol, através da cromatografia líquida de alta eficiência.



## **2- FUNDAMENTAÇÃO** **TEÓRICA**

## **2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

Nesse tópico do trabalho foram expostas as bases teóricas que fundamentam a produção biotecnológica simultânea de xilitol e etanol a partir do bagaço de sisal.

### **2.1 Resíduos agroindustriais**

A cada dia o ser humano produz mais resíduos, e em poucos casos realiza-se um tratamento correto com o que não é mais desejado. Rosa e colaboradores (2011) afirmam a necessidade do desenvolvimento e implementação de processos sustentáveis, agregando valor a resíduos agroindustriais que são descartados no meio ambiente de forma desordenada. No Brasil, o processamento de matérias primas ocorre com o interesse na produção de um produto principal de valor e a biomassa resultante na maioria dos casos é desprezada pelas grandes indústrias (NUNES et al, 2013).

No Brasil são produzidas a cada ano quantidades alarmantes de resíduos resultantes do beneficiamento ou processamento de alimentos. Geralmente os resíduos gerados ficam no local do processamento ou são lançados em locais impróprios para o descarte de materiais desse tipo. Vale salientar que, essa prática além de contribuir em problemas ambientais, alguns resíduos representam perdas de matéria-prima e energia, fazendo com que indústrias tenham mais gastos (BENTO e CASARIL, 2012).

O reaproveitamento de resíduos gerados pela agroindústria é um dos maiores pólos de investimento, mesmo em países com elevado desenvolvimento tecnológico como França e Estados Unidos. Tem sido alvo de vários estudos o que contribui com informações sobre o seu grande potencial nutricional e energético (FILHO e FRANCO, 2015).

### **2.2 Geração de resíduos no processamento de sisal**

A fibra de sisal (*Agave sisalana*) é conhecida mundialmente como uma das fibras mais resistentes do mundo, sendo o Brasil o principal produtor de tal matéria prima (SANTOS et al, 2015). O processamento do sisal ocorre de forma artesanal, onde utiliza-se uma máquina pouco sofisticada conhecida como paraibana (Figura 1).

**Figura 1** – Processamento da fibra do sisal e geração de resíduos

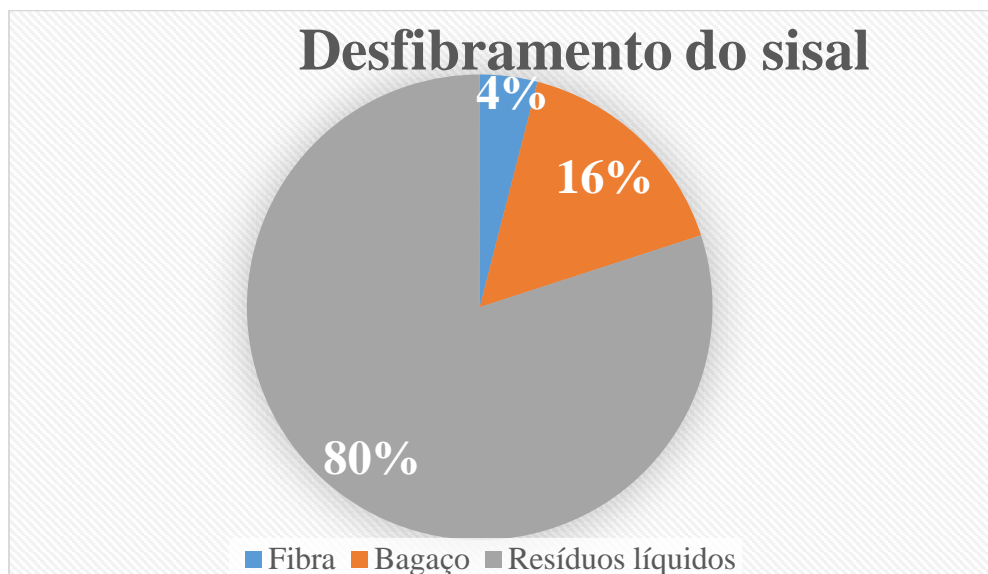


**Fonte** – Autor

Na Figura 1 observa-se que no processamento, inicialmente tem-se o corte das folhas de sisal na monocultura (etapa 1), onde são transportadas para o desfibramento. Na sequência obtém-se a geração de resíduos sólidos e fibras úmidas (etapa 2), que são secas para posterior comercialização (etapa 3)

Cerca de 96% da folha de sisal é convertida em resíduo, sendo uma parte sólida e outra líquida (MENDONÇA, ANDRADE E BRANDÃO 2011), (Figura 2). Sabendo-se que o Brasil produz cerca de 138 mil toneladas de fibra anualmente (IBGE, 2016), gera-se aproximadamente 552 mil toneladas de bagaço no país inteiro, sendo a Paraíba responsável pela geração de 18 mil toneladas.

**Figura 2:** Composição das folhas sisal com relação a fibra, bagaço e resíduos líquidos.

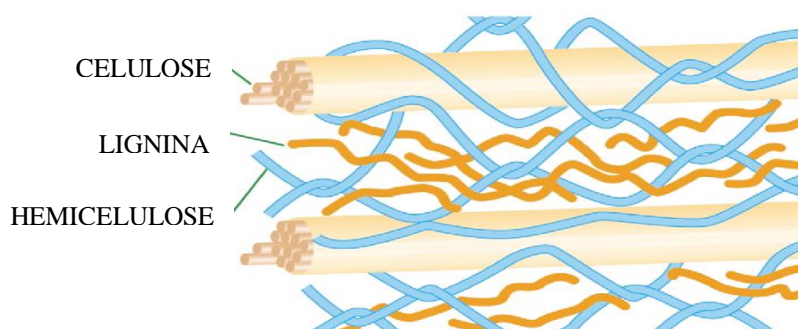


**Fonte:** MENDONÇA, ANDRADE E BRANDÃO 2011.

### 2.3 Biomassa lignocelulósica

Esta biomassa tem despertado interesse, devido sua presença em grande quantidade em muitos países, e representarem uma fonte renovável contínua de materiais estruturais biodegradáveis e de baixo custo (BEZAZI et al, 2014). Os recursos renováveis orgânicos mais abundantes na terra são constituídos basicamente por celulose, hemicelulose e lignina (Figura 3), sendo esses classificados como materiais lignocelulósicos (ASADA et al, 2015).

**Figura 3** – Composição dos materiais lignocelulósicos



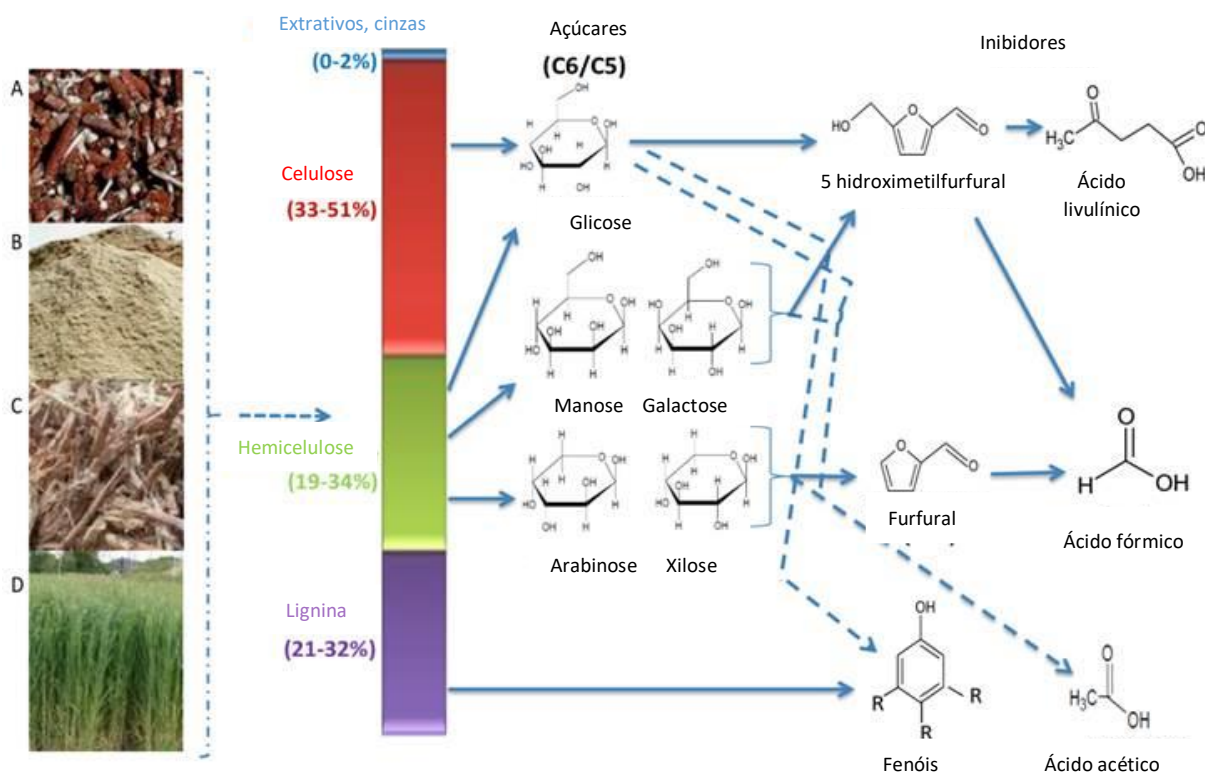
**Fonte** – Adaptado de: BOUDET et al., 2003

Esses constituintes são polímeros, sendo que a celulose e hemicelulose são protegidos pela lignina contra a hidrólise química ou enzimática (LACERDA et al., 2013). Sendo assim, se faz necessário um pré-tratamento para a deslignificação a fim de converter o material

lignocelulósico em açúcares fermentescíveis, como a xilose e a glicose (WAGHMARE et al, 2014).

A hemicelulose é um polímero ramificado composto de açúcares, tais como as pentoses e hexoses (GARCIA-MARAVÉ et al, 2013). A xilose é uma pentose, que pode ser convertida em xilitol e etanol por meios químicos, através de reação de hidrogenação, através de rotas microbiológicas, no qual microrganismos realizam essa conversão. Porém, um processo que tem despertado grande interesse dos pesquisadores é o de produção enzimática, que converte praticamente toda a xilose em subprodutos (ALBUQUERQUE et al, 2014). Porém, o custo benefício para tal prática é muito elevado, sendo essa uma desvantagem da técnica. A seguir observa-se a composição dos materiais lignocelulósicos, a obtenção de açúcares (pentoses e hexoses) a partir das frações celulósica e hemicelulósica da biomassa além da geração de inibidores fermentativos a partir da degradação de açúcares (Figura 4).

**Figura 4** – Composição de materiais lignocelulósicos e subprodutos gerados



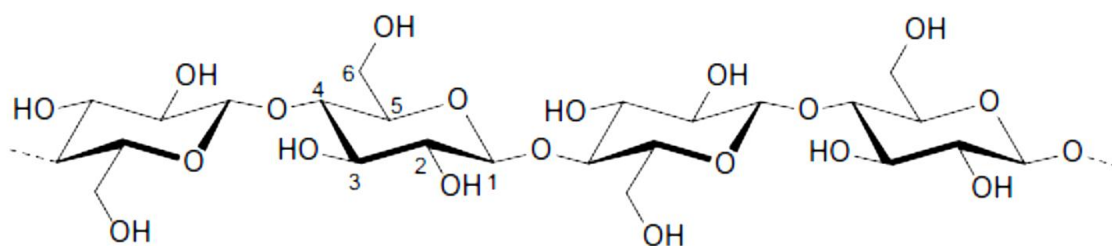
**Fonte** – Adaptado de IBRAHEEM e NDIMBA, 2013

## 2.4 Celulose

A celulose é o recurso orgânico renovável mais abundante na terra e o seu montante anual supera a escala em bilhões de toneladas, revelando assim o seu grande valor econômico. As células de plantas têm como componente principal a celulose, porém alguns animais (tunicados) e algumas bactérias apresentam, em teores menores, a presença de tal polímero no seu material. a celulose já é de grande importância na indústria de papel e na têxtil, porém somente nos últimos anos verificou-se o seu potencial para geração de bioenergia com a finalidade de produção de energia limpa do futuro (CHEN, 2014)

As fontes de celulose comercial têm como fontes primárias principalmente o algodão e a madeira, onde o seu teor em alguns casos podem chegar a atingir 98 e 90% respectivamente (SUHAS et al. 2016). Ela é um polissacarídeo linear, constituído por um único tipo de unidade de açúcar, e é formada por unidades de monossacarídeos de glicose, que se ligam entre si através dos carbonos 1 e 4, originando um polímero linear (NAVARRO et al., 2007). A sua fórmula molecular corresponde a  $(C_6H_{10}O_5)_n$  (Figura 5).

**Figura 5** – Fórmula estrutural da celulose.



**Fonte** – HEINZE, 2015.

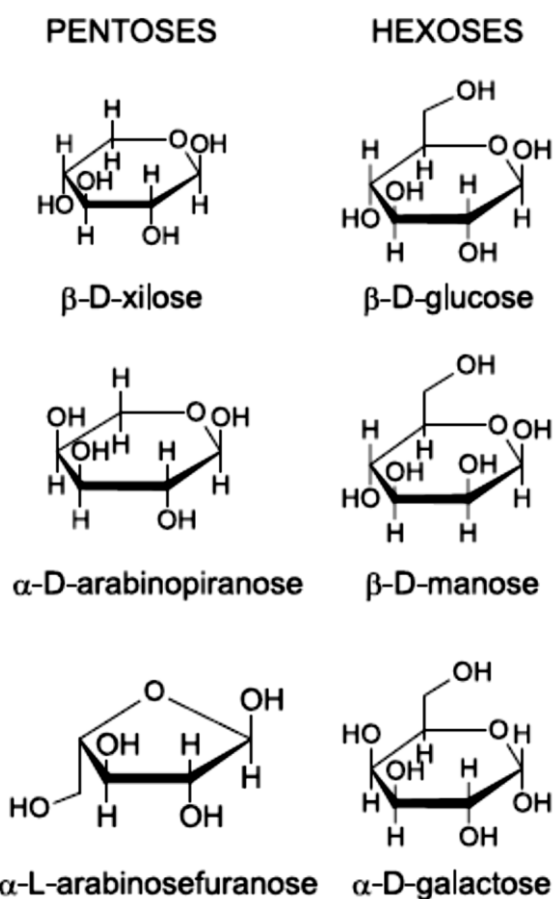
## 2.5 Hemicelulose

A hemicelulose é composta por cadeias de açúcares de 5 e 6 carbonos que contribuem para a produção de açúcar solúvel (ROSE et al., 2015), sendo esses açúcares denominados como pentoses (xilose e arabinose) e/ou hexoses (glicose, manose e galactose) (CARVALHO et al., 2009). O papel biológico mais importante da hemicelulose é a sua contribuição para o reforço da parede celular por interação com a celulose e, em algumas paredes, com a lignina. Esses

recursos são discutidos em relação aos modelos amplamente aceitos da parede primária (SCHELLER e PETER ULVSKOV, 2010).

A hemicelulose é um polímero facilmente solubilizado em temperaturas baixas, despertando assim um grande interesse no seu estudo, já que não se gasta tanta energia para trabalhar em condições elevadas. O componente majoritário e de maior interesse dessa fração é a xilose (GROFF et al. 2012), que apresenta fórmula molecular ( $C_5H_{10}O_5$ ) e peso 150,13 g/mol. Os principais componentes gerados a partir da solubilização da hemicelulose estão apresentados na Figura 6, destacando-se as pentoses e hexoses formadas.

**Figura 6** – Principais açúcares solubilizados a partir da fração hemicelulósica.

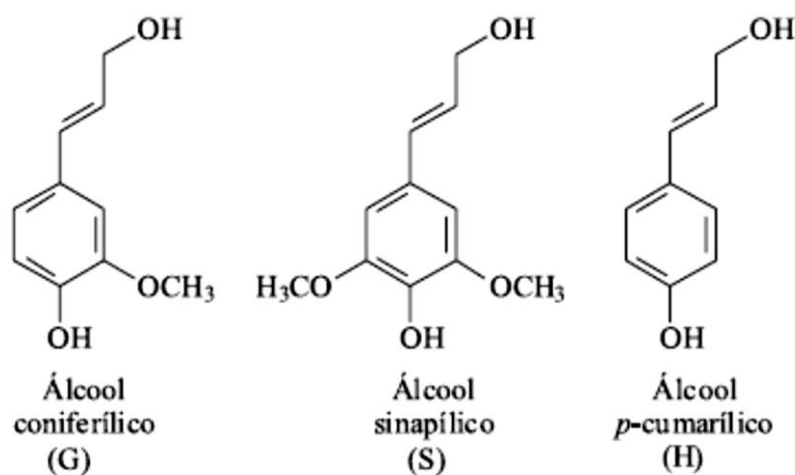


**Fonte** – Adaptado de MORAIS et al. 2005

## 2.6 Lignina

A lignina exerce uma função muito importante nos materiais lignocelulósicos, onde o mesmo atua como uma cola que faz com que a celulose e hemicelulose permaneçam juntas (WATKINS et al., 2015). Em geral, a lignina é classificada de acordo com a quantidade relativa dos monômeros guaiacila (G), siringila (S) e *p*-hidroxifenila (H), derivados dos álcoois coniferílico (4-(3-hidroxi-1-propenil)- 2-metoxifenol), sinapílico (4-(3-hidroxi-1-prop-1-enil)- 2,6-dimetoxifenol) e *p*-cumarílico (4-(3-Hidroxi-1-prop-1-enil)fenol) (Figura 7) (GIRISUTA et al., 2013).

**Figura 7** –Álcoois precursores da formação da lignina.



Fonte – BARBOSA et al., 2008.

A lignina é o terceiro maior componente da biomassa lignocelulósica, e desempenha um papel importantíssimo nas plantas, já que é responsável pela proteção contra degradação microbiana (AYENI et al., 2015). Berjan e colaboradores (2003) afirmam que o processo de remoção da lignina requer grandes quantidades de energia e grande demanda de reagentes químicos, o que torna um processo ainda muito trabalhoso. Ultimamente muitos estudos referentes à lignina vêm sendo realizados, pois há enorme interesse dentro do tema devido à possibilidade de se obter plantas mais adequadas aos processos de deslignificação usados tanto na indústria de celulose e papel como na conversão da biomassa lignificada em etanol (CARVALHO et al., 2009).

Muitos pesquisadores têm focado suas pesquisas nesse processo de deslignificação de biomassa lignocelulósica. O intuito principal é a remoção desses compostos fenólicos,

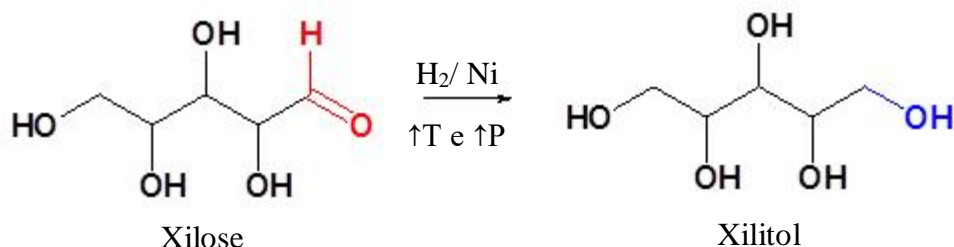


removendo assim essa proteção dos carboidratos totais (WEINWURM et al., 2016). Essa remoção ocorre a partir de alguns pré-tratamentos, os meios ácidos ou alcalinos são os mais convencionalmente usados, em temperaturas medianas. Ren e colaboradores (2016) afirma ser necessário primeiramente a realização desses pré-tratamentos afim de uma melhor utilização e aproveitamento da biomassa lignocelulósica.

## 2.7 Xilitol

O xilitol é um poliálcool (poliol), ou seja, um álcool que se apresenta ligado a cada átomo de carbono de sua molécula, um grupo hidroxila. Sua fórmula química é  $C_5H_{12}O_5$ , e pode ser encontrado em líquens, fungos, algas e vegetais, sendo também um intermediário do metabolismo de carboidratos no homem (GRASSE, 2012). A sua produção pode ocorrer por rotas biotecnológicas ou químicas. No caso da rota química a conversão de xilose a xilitol é representada na Figura 8 pela reação de hidrogenação.

**Figura 8:** Conversão de xilose a xilitol (reação de hidrogenação).



Fonte – Adaptado de <http://luvicecream.com/sweeteners/>

Ao contrário de sacarose, xilitol não é metabolizado por microrganismos na boca e, portanto, alimentos adoçados com xilitol não causam deterioração nos dentes. Além disso, o xilitol é um substituto do açúcar totalmente metabolizável para diabéticos (TOCHAMPA et al., 2005). O xilitol vem sendo usados como adoçante na indústria alimentar. Esse poliol tem um calor de solução baixo e boa solubilidade em água, provocando uma sensação de frescura quando consumida por via oral. Devido aos seus efeitos benéficos à saúde, tornando assim um edulcorante global: é usado principalmente em gomas de mascar, balas, doces e creme dental (SARROUH e SILVA, 2013). As propriedades desse composto estão representadas na Figura 9.

**Figura 9:** Propriedades químicas e físicas do xilitol.

<b>Propriedades</b>	<b>Características ou Valores</b>
Fórmula empírica	$C_5H_{12}O_5$
Massa molar	152,15 g/mol
Aparência	Pó cristalino
Cor	Branca
Sabor	Doce
Odor	Nenhum
Ponto de Fusão	92-96 °C
Ponto de Ebulição	216 °C (1 atm)
pH (solução aquosa a 10%)	5-7
Densidade (solução aquosa a 10%)	1,03 g/mL
Solubilidade em água a 20 °C	63 g/100 g solução
Viscosidade (solução aquosa a 10%)	1,23 cP (a 20 °C)
Calor de Solução (endotérmico)	34,8 cal/g
Valor Calórico	2,4 kcal/g
Índice de Refração (25 °C)	1,3471 (solução aquosa a 10%)
Higroscopicidade	Em elevada umidade relativa, é mais higroscópico que a sacarose e menos que o sorbitol
Poder adoçante	Similar ao da sacarose, superior ao do sorbitol e manitol
Estabilidade	Estável a 120 °C (não carameliza)

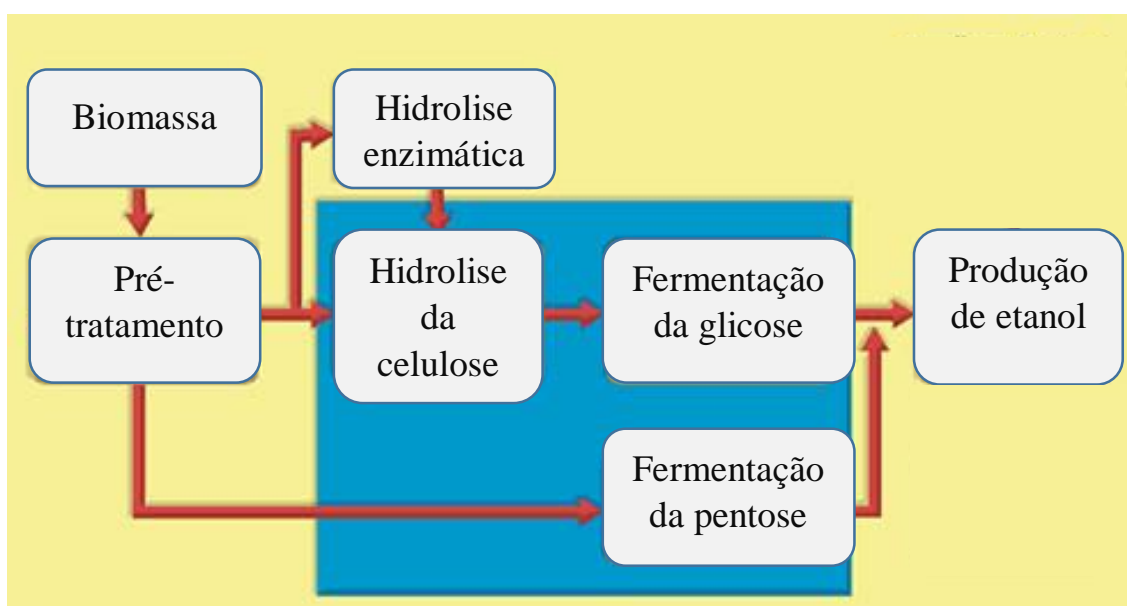
Fonte: MUSSATO e ROBERTO, 2002.

## 2.8 Etanol

O etanol de segunda geração (2G) produzido a partir de biomassa lignocelulósica foi considerado o biocombustível com o maior potencial para substituir os combustíveis à base de petróleo (PEREIRA et al. 2015). Camargo e Sene 2013 afirmam que o etanol de segunda geração produzido a partir de resíduos agroindustriais despertou o interesse da comunidade científica, já que mostrou como uma possível solução para a sustentabilidade energética. Porém os custos para essa técnica ainda são bem elevados, o que torna uma desvantagem do processo. Esse processo pode ser simplificado e removidas algumas etapas, o que pode torná-lo vantajoso. A Figura 10 mostra que ao utilizar a fração hemicelulósica da biomassa obtêm-se etanol,

livrando algumas etapas, como uma hidrólise propriamente dita ou a utilização de enzimas, que torna o processo mais caro. Outra vantagem da fermentação das pentoses é a facilidade de solubilizar esses açúcares presentes na hemicelulose, onde não se trabalha em temperaturas elevadas e teores de ácido muito alto, que contribui para danificar os equipamentos (OGEDA e PETRI, 2010).

**Figura 10:** Fluxograma representativo das etapas de produção de etanol a partir da xilose e glicose.



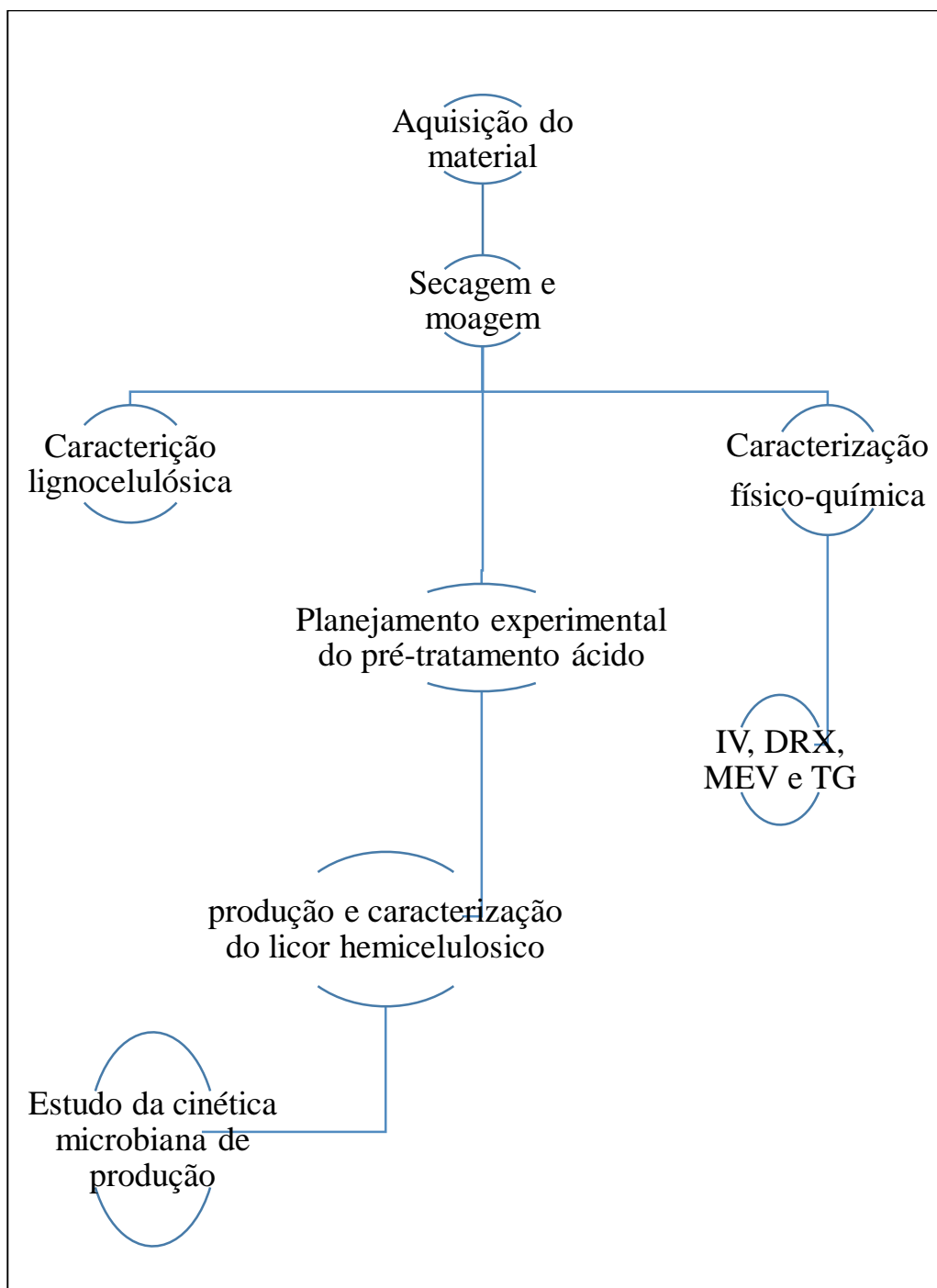
Fonte: adaptado de (RFA, 2016). Disponível em: <http://old.ethanolrfa.org/pages/how-ethanol-is-made>. Acesso em 2016.

# **3- MATERIAIS E** **MÉTODOS**

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Nesse trabalho foram executadas as etapas apresentadas na Figura 11.

**Figura 11:** Fluxograma representativo das etapas executadas na pesquisa.



Fonte – Autor.

A seguir foram descritos cada um dos métodos aplicados no trabalho.

### 3.1 Aquisição do bagaço do sisal e pré-tratamento físico

O bagaço de sisal resultante do processo de desfibramento das folhas de sisal (Figura 12) foi coletado na Fazenda Lagoa Cercada, localizada na cidade de Nova Floresta – PB. O bagaço de sisal foi seco a 70 °C em estufa com circulação e renovação de ar SL – 102. Após a retirada da umidade superficial o material foi moído em moinho de facas SL – 31 Solab e uniformizado na granulometria de 60 mesh. Em seguida armazenado em sacos plásticos para análises posteriores.

**Figura 12:** Processamento do sisal e geração de resíduos sólidos.



**Fonte – Autor.**

### 3.2 Caracterização lignocelulósica

Para realizar a caracterização lignocelulósica do bagaço de sisal foi utilizando a metodologia da EMBRAPA 236, *ISSN 0103 – 0205* (2010) que descreve os procedimentos para determinação dos componentes presentes na biomassa.

#### 3.2.1 Umidade

Para determinação do teor de água presente na amostra uma cápsula de metal foi seca a 105 °C durante 5 horas. Logo após levou-se o recipiente ao dessecador deixando-o durante 30 minutos para garantir o resfriamento até a temperatura ambiente. Pesou-se a cápsula e adicionou-se 6,0000 g do bagaço de sisal levando novamente a estufa para passar um período de 24 horas sob aquecimento a 105 °C para remoção total da umidade do material. O experimento foi realizado em triplicata (Figura 13).

**Figura 13:** Determinação do teor de umidade no bagaço de sisal



**Fonte – Autor.**

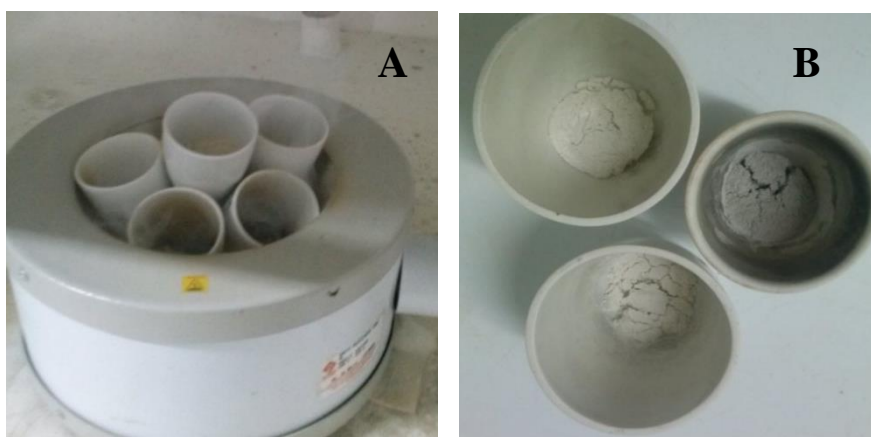
O cálculo para determinação do teor de umidade é feito a partir da equação 1, onde TU corresponde ao teor de umidade, MRAU é a massa do recipiente mais a do material com umidade, MRAS é a massa do recipiente com material sem umidade e MAU é a massa inicial do material.

$$TU\% = \frac{(MRAU - MRAS) \times 100\%}{MAU} \quad \text{Equação 1.}$$

### 3.2.2 Cinzas

Para determinação os cadinhos de porcelana foram previamente secos a 550 °C durante 1 hora e resfriados num dessecador durante 30 minutos. O recipiente foi pesado e adicionou-se 2,0000 g do material, e levado para realizar a carbonização inicial numa manta aquecedora (figura 14). Após a carbonização inicial o material foi levado a mufla modelo zang 2000 C, onde utilizou-se uma rampa de aquecimento de 10 °C/min até atingir a temperatura de trabalho, 550 °C. Deixou-se o material durante 24 horas sob aquecimento, no dia seguinte pesou-se o recipiente com as cinzas para o cálculo do teor de cinzas.

**Figura 14:** A - Carbonização do bagaço de sisal; B - Cinzas do bagaço de sisal.



**Fonte** – Autor.

Para o cálculo do teor de cinzas (TC%) usou-se a massa da cápsula (MR), massa do material (MA) e a massa do recipiente com cinzas (MRAC), conforme é possível observar na equação 2:

$$TC\% = \frac{(MRAC - MR) \times 100\%}{MA} \quad \text{Equação 2.}$$

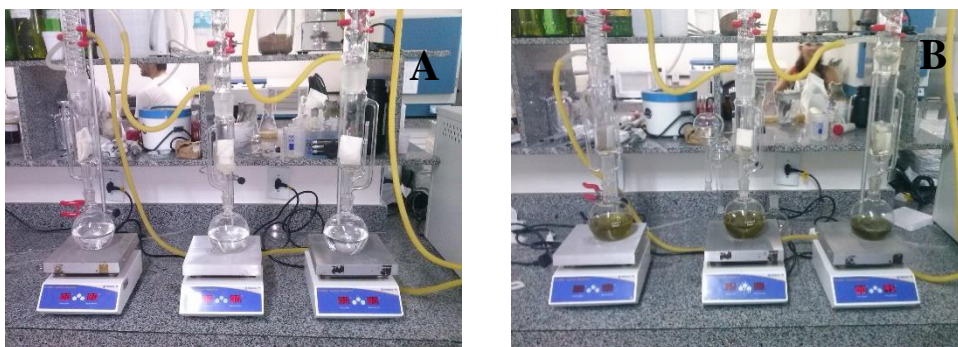
### 3.2.3 Extrativos

A determinação dos organosolúveis se deu através da extração por soxhlet (figura 15.A) tendo como solução extratora uma mistura de etanol e ciclohexano, na proporção de 1:1. A



quantidade de massa usada para determinar o teor de extrativos foi de 5,500 g durante 12 horas. Essa massa foi adicionada num papel de filtro previamente seco e de massa determinada. Após a remoção total dos extrativos do material (figura 15.B), realizou-se a recuperação da solução para uma posterior extração e levou-se os cartuchos para secarem na estufa durante 18 horas.

**Figura 15:** A - Sistema de soxhlet usado para remoção de extrativos; B - Extrativos totalmente solubilizados na solução extratora.



**Fonte** – Autor.

Após a secagem, realizou-se a pesagem do papel com o material sem extrativo para a determinação do teor do constituinte (TE%) no bagaço de sisal. Para quantificar esse valor utilizamos a equação 3, onde MRE é a massa do papel filtro mais a amostra com extrativo, MRRS é a massa do papel filtro com a amostra sem extrativo e MA é a massa da amostra inicial.

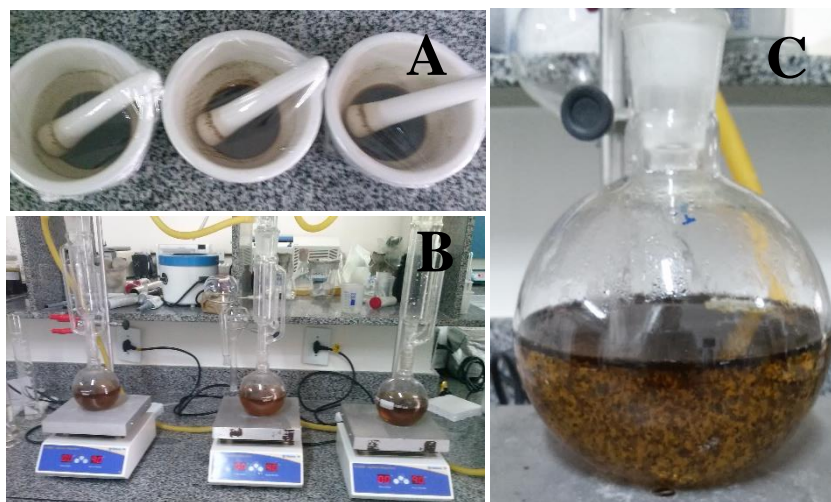
$$TE\% = \frac{(MRE - MRRS) \times 100}{MA} \quad \text{Equação 3.}$$

#### 3.2.4 Lignina

Para determinação da lignina colocou-se 1 g do material sem extrativo e sem umidade, adicionou-se 17 mL de uma solução de ácido sulfúrico a 72%, macerando vigorosamente e cuidadosamente durante 15 minutos. Após esse procedimento, reservou-se o recipiente para a próxima etapa em 24 horas (figura 16.A). No dia seguinte, adicionou-se 306 mL de água destilada a mistura e transferiu para o balão de fundo chato, levando para o sistema de soxhlet durante 4 horas (Figura 16.B). Após esse período, quando se observou o material floculado

(Figura 16.C) desligou-se as chapas, esperou esfriar e realizou-se a filtração do material com auxílio de uma bomba a vácuo. Lavou-se os resíduos sólidos até pH neutro, e seco durante 5 horas na estufa de circulação de ar a 105 °C.

**Figura 16:** A - Repouso de 24 horas da biomassa em contato com ácido sulfúrico 72%; B – Aquecimento no sistema de soxhlet; C - Floculação das partículas de lignina.



**Fonte – Autor.**

Para determinação do teor de lignina (TL%) usamos a massa do papel filtro (MF), a massa do papel com a lignina (MFL) e a massa inicial da amostra (MA), conforme a equação a seguir.

$$TL\% = \frac{(MFL - MF) \times 100}{MA} \quad \text{Equação 4.}$$

### 3.2.5 Holocelulose

Para determinação dos carboidratos totais, holocelulose, adicionou-se 3,0000 g do material sem extrativo e sem umidade em um erlenmeyer de 1 L, 120 mL de água destilada, 2,5 g de clorito de sódio ( $\text{NaClO}_2$ ) e 1mL de ácido acético glacial. Levou-se a mistura ao banho maria a 70 °C, sob a agitação (Figura 17). O clorito de sódio e o ácido acético foram adicionados mais duas vezes, de hora em hora nas mesmas quantidades. Após a terceira adição o material continuou no banho e sob agitação por mais 3 horas.

**Figura 17:** Sistema de Banho Maria para a obtenção de holocelulose.



**Fonte – Autor.**

O material restante no funil foi filtrado, lavado até pH neutro e levado a estufa para secar. A quantificação da holocelulose (TH%) foi determinado a partir da massa do papel filtro (MF), da massa do papel filtro com o resíduo seco (MFH) e da massa da amostra (MA), conforme a equação a seguir:

$$TH\% = \frac{(MFH - MF) \times 100}{MA} \quad \text{Equação 5.}$$

### 3.2.6 Alfa-celulose

A alfa-celulose foi obtida a partir da holocelulose, onde pesou-se 1,0000 g dos carboidratos totais e inseriu num almofariz. Adicionou-se 15 mL de uma solução de hidróxido de sódio a 17,5%, aguardou 2 minutos para a amostra entrar totalmente em contato com a solução e na sequência macerou-se durante 8 minutos, conforme a figura a seguir.

**Figura 18:** Holocelulose em contato com uma solução de hidróxido de sódio para determinação da alfa-celulose.



**Fonte – Autor.**

Adicionou-se ao almofariz 40 mL de água destilada, e na sequência realizou-se a filtração, neutralização e secagem do material. Para determinação do teor de alfa-celulose (TA%) utilizamos a massa do papel filtro (MF), a massa do papel filtro com o material seco (MFA) e a massa inicial da amostra (MA), conforme a equação a seguir:

$$TA\% = \frac{(MFA - MF) \times 100}{MA} \quad \text{Equação 6.}$$

O teor de hemicelulose (TeM) presente no bagaço de sisal é determinado a partir da diferença entre o teor de holocelulose e alfa-celulose, conforme a equação a seguir:

$$TeM\% = TH\% - TA\% \quad \text{Equação 7.}$$

### 3.3 Caracterização físico-química

#### 3.3.1 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos em Espectrofotômetro marca Shimadzu, modelo IR Prestige, utilizando KBr no intervalo de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ . Foram feitas análises do bagaço de sisal antes do pré-tratamento ácido e pós remoção do licor hemicelulósico para verificar mudanças nas bandas de absorção referente a hemicelulose. As análises foram feitas no Laboratório de Combustíveis e Materiais (LACOM).

#### 3.3.2 Difração de raios-X

As análises de DRX foram realizadas em difratômetro Shimadzu, modelo XRD 600 com fonte de radiação  $\text{CuK}\alpha$ , tensão de 40 kV, corrente de 30 mA, velocidade de 2  $^{\circ} \text{min}^{-1}$  e faixa de varredura de  $2\theta = 10$  a  $80^{\circ}$ . Para determinarmos o índice de cristalinidade do material in natura e pós tratamento ácido usamos a equação 8, onde  $I_c$  é a intensidade em um ângulo  $2\theta$  perto de  $22^{\circ}$ , e  $I_a$  é a intensidade em um ângulo  $2\theta$  perto de  $18^{\circ}$ , representando a parte cristalina e amorfa do material respectivamente.

$$Ic = \left[ \frac{I_c - I_a}{I_c} \right] * 100 \quad \text{Equação 8.}$$

### 3.3.3 Análises Termogravimétricas

As curvas termogravimétricas foram obtidas em Analisador Térmico Shimadzu, modelo DTG 60, massa de 7 mg, cadinho de alumina, razão de aquecimento de 10 °C/min., em atmosfera de nitrogênio, fluxo de 100 mL e intervalo de temperatura de ambiente até 900 °C. O estudo térmico foi realizado para o material in natura, pós tratamento ácido e dos seus componentes separadamente.

### 3.3.4 Análises de Microscopia Eletrônica de Varredura

Nas análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) as amostras foram pulverizadas e metalizadas com ouro. A análise foi realizada em Microscópio Eletrônico de Varredura marca Leo Zeiss, modelo 1430, na voltagem de 5kV.

## 3.5 PRÉ-TRATAMENTO

O pré-tratamento ácido foi realizado utilizando ácido sulfúrico diluído com a finalidade de analisar a eficiência na liberação de xilose e glicose contida no bagaço de sisal. Para isso foi realizado um planejamento experimental  $2^2$  com três repetições no ponto central, as variáveis de entrada foram concentração de ácido sulfúrico (0,5, 1,5 e 2,5%) e temperatura (100, 110 e 120 °C) em duplicata, onde -1 representa a menor condição, 1 a maior e 0 o ponto central. O pré tratamento foi realizado em reator de aço inoxidável marca Maitec, durante 1 hora na proporção de 1:10 bagaço de sisal solução ácida (Tabela 1).

**Tabela 1:** Matriz do planejamento experimental  $2^2$  e variáveis de entrada.

Experimento	Teor de ácido	Temperatura
<b>1</b>	-1	-1
<b>2</b>	1	-1
<b>3</b>	-1	1
<b>4</b>	1	1
<b>5</b>	0	0
<b>6</b>	0	0
<b>7</b>	0	0

Os licores do pré tratamento foram analisados e os teores de açúcares e inibidores foram determinados através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando cromatógrafo Varian, modelo ProStar 356, com detector de índice de refração para os açúcares e UV/visível 284 nm para os aldeídos (HMF e furfural) e coluna analítica de aço inox Hi-Plex H Varian (300 mm x 7,7 mm).

Definindo a melhor condição, o licor foi produzido em grande quantidade para realizar a fermentação.

### 3.6 Estudo do microrganismo

A levedura utilizada nesse trabalho foi a *Cândida guilliermondii* CCP 1516, aquisição do Laboratório de Bioengenharia/UFPB na Fundação André Tosello. Para utilização da mesma foi necessário a realização de repicagens com a finalidade de manter a vitalidade da levedura. Na sequência verificou-se o crescimento do microrganismo em meio sintético, verificando o melhor tempo para a realização da fermentação (SILVA, 2013).

#### 3.6.1 Repicagem

Preparou-se o meio de cultura na seguinte proporção de reagentes (preparo de 1 L de solução):

**Tabela 2:** Reagentes usados no meio de cultura

Meio de cultura YMA – “Yeast-Malte Extract Agar”	
Extrato de levedura	3,0 g
Extrato de malte	3,0 g
Peptona Bacteriológica	5,0 g
Dextrose	10,0 g
Ágar	20,0 g

Todas as vidrarias e o meio de cultura foram autoclavados (autoclave vertical – Phoenix Luferco) durante 30 minutos a uma temperatura de 120 °C. Após esterilização matérias e secagem das vidrarias, utilizou-se a capela de fluxo (Cabine de segurança biológica classe II

A1 - Filterflux), previamente esterilizada com álcool 70% e em seguida UV por 15 minutos para repicagem do microrganismo. O meio autoclavado foi adicionado as placas de petri, onde esperou-se um tempo até criar uma consistência gelatinosa, e logo após com auxílio de uma alça de platina esterilizada retirou-se o microrganismo de outra placa antiga passando-a sobre as novas placas em zig-zag (Figura 19). Todas as placas repicadas foram devidamente envolvidas afim de evitar contaminação, e incubadas no Shaker (Shaker refrigerada Logen Scientific – 4900 - TZH) durante 48 horas numa temperatura de 28 °C, e depois levada a geladeira. As repicagens eram feitas de 3 em 3 meses a fim de manter a vitalidade do microrganismo.

**Figura 19:** Repicagem.



**Fonte –** Autor.

### 3.6.2 Pré-inóculo e crescimento da levedura

O estudo do crescimento do microrganismo se deu pela massa seca e contagem de células. O meio de crescimento foi feito a partir do preparo de uma solução contendo:

**Tabela 3:** Reagentes e quantidades usadas no meio de crescimento (SILVA, 2013).

Meio de cultivo (1 litro de solução)	
Xilose	30,0 g
Sulfato de Amônio	2,0 g
Cloreto de cálcio	0,1 g
Farelo de arroz	20,0 g

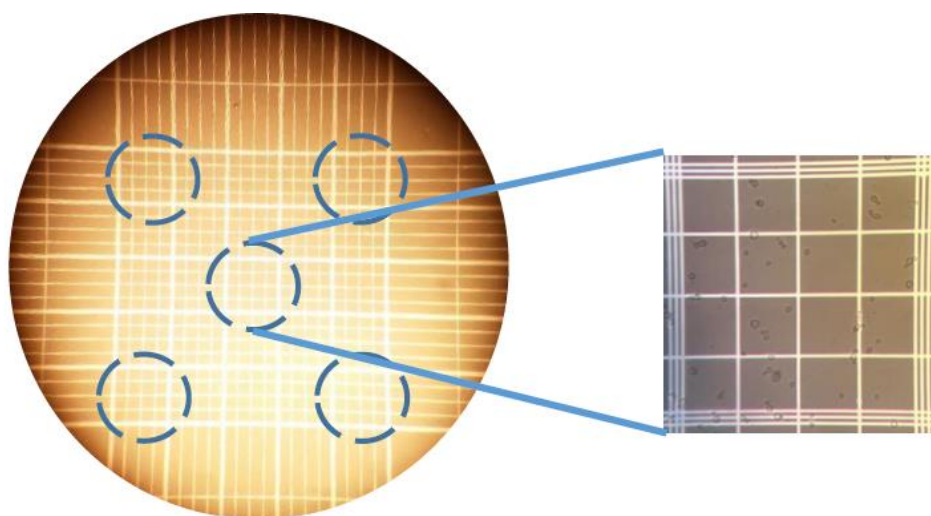


O meio de crescimento foi feito a partir do sobrenadante de uma solução de farelo de arroz a 20g/L obtido através de uma centrifugação com velocidade de 6000 rpm durante 15 minutos (centrifuga refrigerada – novatecnica). Foi adicionado os outros reagentes da Tabela 3 e autoclavado novamente. Após a esterilização, o meio sintético foi levado a cabine bacteriológica para inserção do microrganismo no mesmo. Esse procedimento se deu a partir da retirada da levedura das placas de petri com a alça de platina, e adicionada em um béquer contendo 10 ml de água esterilizada. Após a água ficar bem turva devido a adição da levedura, inseriu-a no meio sintético. O estudo do crescimento foi realizado em erlenmeyers de 1 L, com volume inicial de 200 mL, numa agitação de 200 rpm e temperatura de 30 °C.

Na análise do crescimento celular por massa seca, foi determinado previamente a quantidade de pontos a serem coletados durante o período das 120 horas (0,6, 12, 24, 36, 48, 54, 60, 72, 96 horas), onde retirou-se 2 mL do meio sintético e inserido em um eppendorf seco e massa conhecida. O mesmo foi centrifugado em uma centrífuga (mini spin Plus - Eppendorf) durante 10 minutos a uma velocidade de 10000 rpm, retirando o sobrenadante e levando o resíduo sólido a uma estufa a 105 °C por 24 h.

A análise do crescimento por câmara de Neubauer também se deu nos mesmos tempos do estudo de massa seca. Retirou-se uma pequena alíquota do meio sintético, fazendo diluição de acordo com a necessidade. A contagem se deu através da contagem dos quatros quadrantes externos e o central conforme a figura a seguir.

**Figura 20** – Contagem de células por Câmara de Neubauer



**Fonte** –Autor.



Após a contagem das cinco regiões usou-se a Equação 9, obtendo assim a concentração celular em número de células/mL

$$\text{Quantidade de células/mL} = (\sum 5 \text{ quadrados}) \times (5 \times 10^4) \times \text{diluição} \quad \text{Equação 9.}$$

### 3.6.3 Fermentação

A concentração do licor foi realizada no rotavapor, na proporção de evaporação de 2,5 do licor inicial com intuito da remoção de inibidores e aumento dos teores de xilose. Após a concentração realizou-se o ajuste do pH do pré-hidrolisado para 5,4; melhor condição para a levedura, com óxido de cálcio (CaO). Após a neutralização realizou-se a filtração do licor, devido ocorrer a precipitação de partículas sólidas, as quais poderiam interferir no processo fermentativo.

Na sequência realizou-se o inóculo no licor, onde o meio sintético foi centrifugado à 6000 rpm durante 15 minutos, e na proporção meio a ser fermentado foi adicionado afim de que no ponto inicial tivesse 3g/L ou  $10^7$  células/mL. O processo fermentativo foi realizado em erlenmeyer de 500 mL e volume inicial de 200 mL, sob agitação de 200 rpm e temperatura de 30 °C, sem adicionar nutrientes ao licor hemicelulósico. Os tempos da fermentação estudados foram: 0, 4, 8, 12, 24, 36, 72, 96 e 120 horas. As alíquotas foram adicionadas em eppendorfs e refrigeradas para análise em CLAE. O rendimento e a eficiência na conversão de xilose em xilitol foram verificados a partir dos tratamentos matemáticos apresentados a seguir:

- Rendimento

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{(P_f - P_i)}{(S_i - S_f)} \quad \text{Equação 10}$$

Em que:

$Y_{P/S}$ : é o rendimento da produção de xilitol baseado no consumo de xilose (g xilitol/g xilose)

$P_f$ : concentração final de xilitol (g/L)

$P_i$ : concentração inicial de xilitol (g/L)

$S_f$ : concentração final de xilose (g/L)

$S_i$ : concentração inicial de xilose (g/L)

- Eficiência

$$E(\%) = \left( \frac{Y_{P/S} \text{ experimental}}{Y_{P/S} \text{ teórico}} \right) * 100 \quad \text{Equação 11}$$

Em que:

$E$ : é a eficiência na conversão de xilose em xilitol

$Y_{P/S}$  teórico: eficiência teórica na conversão de xilose em xilitol.

# **RESULTADOS E**

---

# **DISCUSSÃO**

---

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

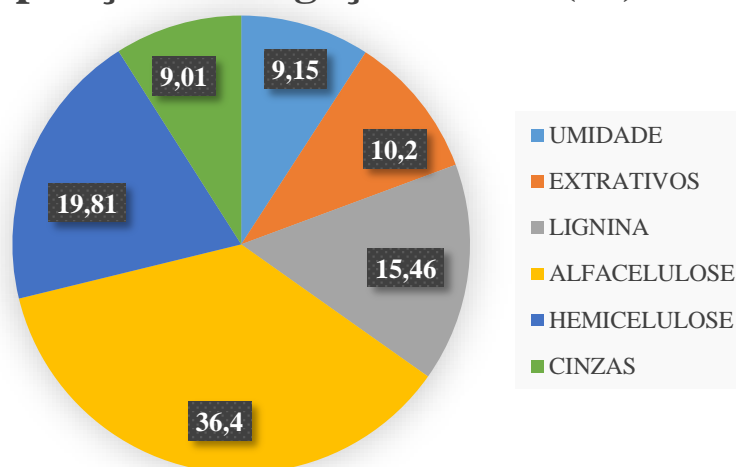
Os resultados obtidos serão apresentados a seguir com suas respectivas discussões.

### 4.1 COMPOSIÇÃO LIGNOCELULÓSICA

A partir da caracterização lignocelulósica a composição do bagaço de sisal foi determinada (Figura 21). O componente em maior quantidade foi a alfa-celulose (36,4%), o segundo maior foi a hemicelulose (19,81%), sendo essa a fração de interesse do trabalho e a lignina o terceiro maior constituinte (15,46%).

**Figura 21:** Composição lignocelulósica do bagaço de sisal.

#### Composição do bagaço de sisal (%)



**Fonte** –Autor.

Observa-se que a alfa-celulose, hemicelulose e lignina são os componentes em maior percentual do bagaço de sisal. Para efeito de comparação, relaciona-se a composição do material trabalhado com outros tipos de biomassa apresentados na literatura. O bagaço do agave azul é o material mais semelhante devido pertencer a mesma família. O bagaço e a palha da cana de açúcar são responsáveis pelo maior percentual de biomassa gerada no Brasil e o algodão é uma cultura popular no Brasil (Tabela 4).

**Tabela 4:** Composição lignocelulósica do bagaço de sisal, bagaço do agave azul (Vandenbossche et al 2014), bagaço de cana (Mesa et al, 2010), palha de cana (Pereira et al 2015) e algodão (Morais et al, 2013).

Analises	Bagaço de sisal (%)	Bagaço do agave azul (%)	Bagaço de cana (%)	Palha de cana (%)	Algodão (%)
Lignina	15,46	18,4	27,2	11,1	0,68
Celulose	36,40	38,9	49,0	41,1	76,9
Hemicelulose	19,81	16,9	15,8	35,1	4,6

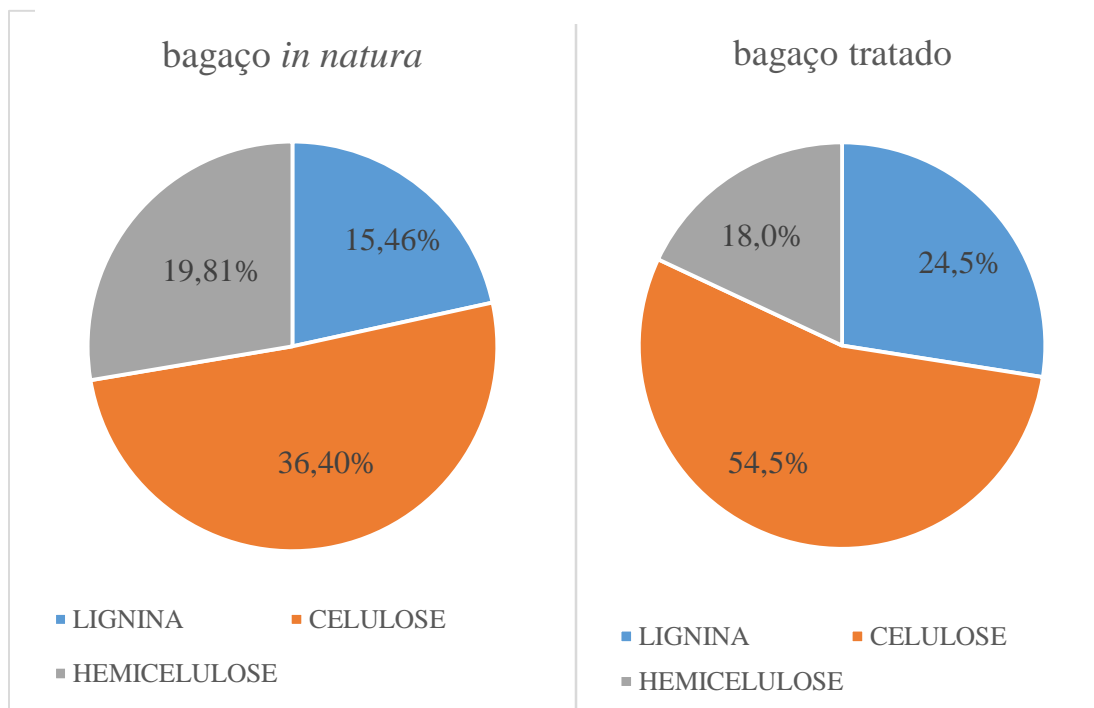
Os materiais nos quais os carboidratos totais (celulose e hemicelulose) são mais protegidos pela lignina são o bagaço de cana e o bagaço do agave azul, o percentual de lignina correspondeu a 27,2 e 18,4% respectivamente. Na sequência tem-se o bagaço de sisal com 15,46%; vantagem com relação aos outros materiais, devido ter menor proteção dos carboidratos, facilitando assim ataques ácidos. Os teores de celulose são bem próximos, com exceção ao algodão, que praticamente todo o material é composto por alfa-celulose. Nas outras biomassas o percentual variou de 36 a 49%. Todos apresentam bom potencial para produção de hexoses para posterior fermentação, através de hidrólise ácida ou enzimática.

A palha da cana de açúcar apresentou o maior teor hemicelulósico (35,1%), seguido do bagaço do sisal com 19,81%. O que mais se assemelha com a biomassa trabalhada é o bagaço do agave azul, apresentando teor hemicelulósico de 16,9%. O bagaço de cana apresenta teor próximo, porém ainda menor do que o do bagaço do sisal. O algodão apresentou o menor valor de hemicelulose, sendo um material de pouco interesse para produção de pentoses para posterior fermentação.

Ao comparar os três componentes majoritários do bagaço de sisal *in natura* e pós tratamento ácido (Figura 22) verifica-se diminuição na fração hemicelulósica do bagaço de sisal tratado devido a solubilização das pentoses e aumento no teor de lignina e celulose, os quais ficaram mais expostos. Esse mesmo comportamento de diminuição da fração hemicelulósica, aumento da lignina e da celulose também foi observado por Candido e colaboradores (2012) para o bagaço de cana submetido ao pré-tratamento ácido, com concentração a 10% e temperatura de 100 °C. Como o teor de ácido sulfúrico foi maior, provocou maior solubilização das pentoses, diminuindo 10% a hemicelulose, já no caso do bagaço do sisal reduziu de 19,8

para 18%. No caso da lignina e celulose ocorreu aumento de 5 e 6% respectivamente para o bagaço de cana e para o bagaço de sisal de 9 e 18%.

**Figura 22:** Componentes lignocelulósicos do bagaço de sisal in natura e pós tratamento ácido



**Fonte – Autor.**

## 4.2 Pré-tratamento

Os teores de açúcares e inibidores produzidos no pré-tratamento experimental foram quantificados por cromatográfica líquida de alta eficiência CLAE (Tabela 5). A condição de maior teor de ácido (2,5%) e maior temperatura (120 °C) foi a que obteve a maior remoção de xilose (6,2 g/L).

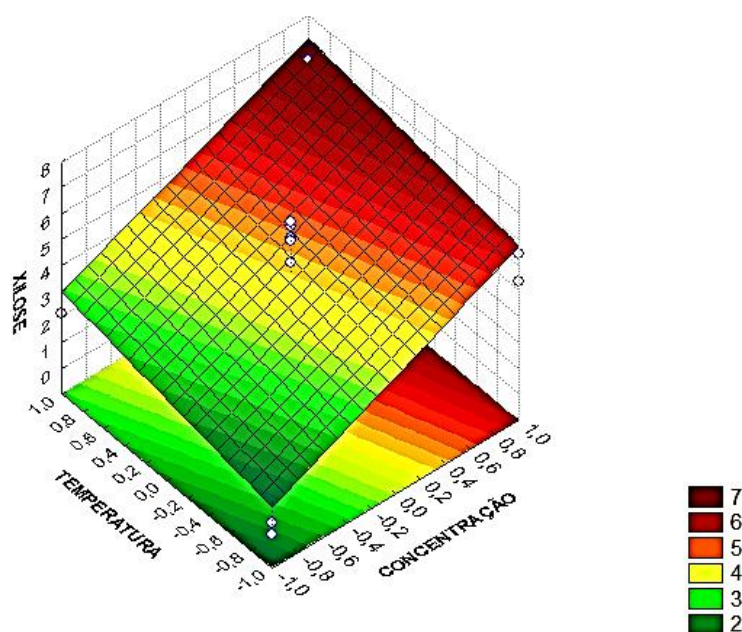
**Tabela 5:** Teores de açúcares e inibidores produzidos no pré-tratamento experimental nas concentrações de ácido (TA) e temperatura (T); ( - ) ponto mínimo, (+) ponto máximo, (0) ponto central.

TA	T	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Celobiose (g/L)	A.Ac (g/L)	HMF (g/L)	Furfural (g/L)
-	-	0,1661	0,2749	0,7118	0,0014		0,0433	0,0022
+	-	2,759	5,4235	2,1475	0,7337		0,1344	0,0453
-	+	0,9085	2,1093	2,2032	1,4084	0,001	0,0905	0,1216
+	+	3,6668	6,2792	1,7353	0		0,2502	0,8487
0	0	2,8578	5,9923	2,3588	0,01		0,1776	0,2069
0	0	2,9203	5,4527	2,5803	0,8548	0,0052	0,169	0,1821
0	0	3,9254	6,1666	2,9632	0,784	0,0962	0,1571	0,1661

TA	T	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Celobiose (g/L)	A.Ac (g/L)	HMF (g/L)	Furfural (g/L)
-	-	0,2797	0,7462	1,1043	0,4904	0,0016	0,0348	0,0821
+	-	2,6273	4,3702	0,0467	0	0	0,1669	0,1412
-	+	0,7772	2,1549	2,1359	1,4136	0,00557	0,0787	0,1216
+	+	3,3706	6,2435	1,6351	0	0	0,2375	0,5708
0	0	2,2073	4,59	2,2557	0,9899	0	0,1154	0,0851
0	0	2,9959	5,5659	2,1666	0,7933	0	0,1601	0,1710
0	0	2,2477	4,6002	2,0660	0,9225	0	0,1211	0,0967

A análise estatística foi realizada através do *software* *Statística 7.0* (Figura 23) e indicou que a condição de maior teor de ácido e maior temperatura foi a mais adequada para a liberação de xilose, a ser convertida em xilitol e etanol. O modelo estatístico foi significativo e linear, com nível de confiança de 95%.

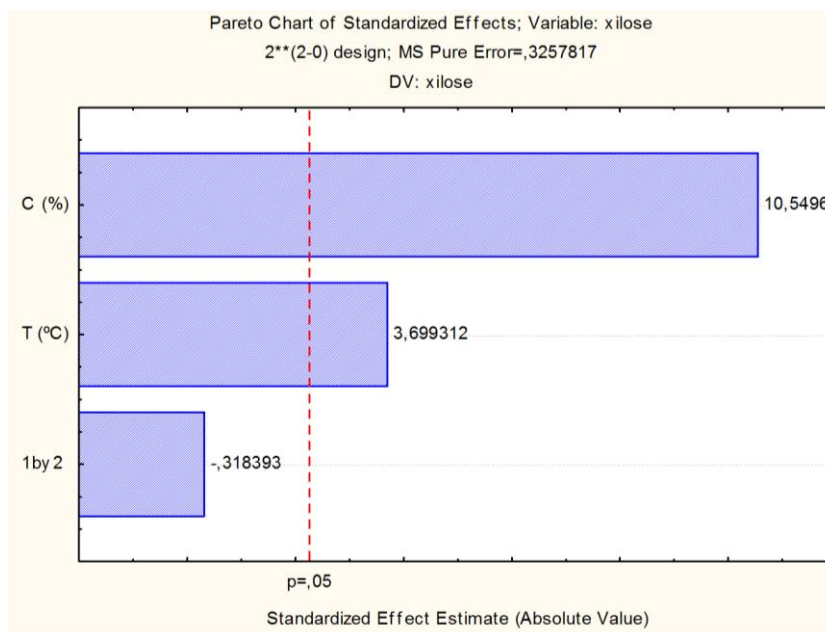
**Figura 23:** Superfície resposta da xilose em relação a temperatura e teor de ácido.



**Fonte:** Statística 7.

Analisando a interferência das variáveis na produção de xilose, observa-se a partir do diagrama de Pareto que tanto a concentração do ácido como a temperatura trabalhada influenciaram no aumento da xilose, porém a interação entre elas não (Figura 24).



**Figura 24** -Diagrama de Pareto para produção de xilose.**Fonte:** Statistica7

Mesmo com o valor de  $R^2$  baixo (Tabela 6), o planejamento experimental foi estatisticamente significativo, com 95% de confiança e confirmado pelo teste F, já que a razão entre o valor calculado e o teórico é maior que 1. Souza e colaboradores (2012) afirma que se esta relação for maior que 1 a regressão será estatisticamente significativa, havendo relação entre as variáveis independentes e dependentes.

**Tabela 6:** Determinação do teste F.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Teste F
<b>Regressão</b>	40,7489	3	13,5829	2,30
<b>Resíduo</b>	15,8942	10	1,5894	
<b>Total</b>	56,6431	13		
<b>% <math>R^2</math></b>	72			
<b><math>F_{\text{tabelado}} = 3,71</math>    <math>F_{\text{calculado}} = 8,54</math></b>				

## Remoção de inibidores

Sabendo a melhor condição a produção do licor foi realizada em grande escala para posterior fermentação. O teor de xilose aumentou, porém apareceu o inibidor ácido acético e os teores de HMF e furfural que estavam em níveis abaixo da toxicidade aumentaram (Tabela 7).

**Tabela 7:** Teores de açúcares e inibidores na melhor condição do pré-tratamento.

TA	T	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	A.Ac (g/L)	HMF (g/L)	Furfural (g/L)
+	+	3,7573	8,7961	2,2221	0,3475	1,6990

Para remover os inibidores fermentativos foi realizada a concentração do licor utilizando rota vapor (Figura 25), depois a diluição do meio. Após esse procedimento a concentração de xilose foi 5,88 g/L, a glicose 3,01 g/L, a arabinose 2,57 g/L, o ácido acético diminuiu para 1,67 g/L e o furfural e HMF foram totalmente removidos do meio fermentativo. O teor de xilose diminuiu devido no ajuste de pH muitas partículas terem precipitado, podendo ter ocorrido sua precipitação.

**Figura 25:** Concentração do licor para remoção de inibidores fermentativos.



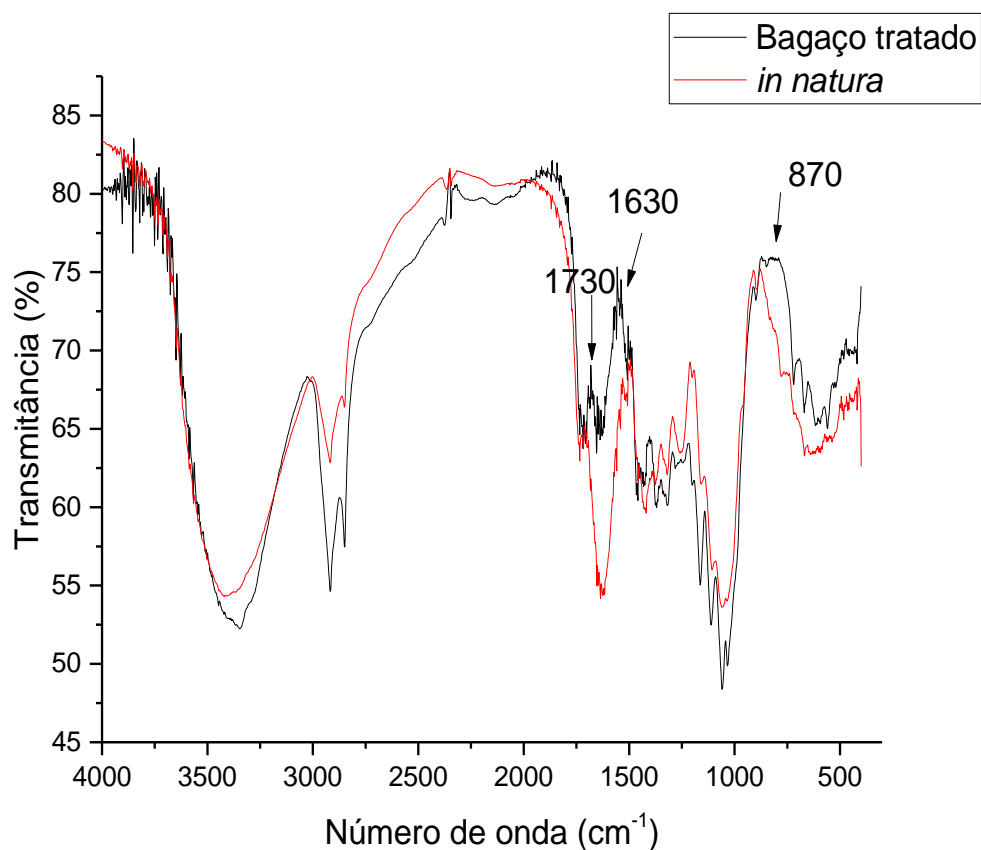
**Fonte – Autor.**

### 4.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

#### 4.3.1 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho

A partir do espectro infravermelho foi possível verificar mudanças composicionais do material lignocelulósico *in natura* e após a realização do pré-tratamento com ácido diluído. Percebe-se uma modificação nas bandas de absorção características da hemicelulose. No comprimento de  $870\text{ cm}^{-1}$  ocorreu modificação do bagaço tratado com relação ao *in natura* sendo essa atribuída ao estiramento de ligações glicosídicas presente na hemicelulose (XU et al., 2013). Nos comprimentos de onda de  $1630$  e  $1730\text{ cm}^{-1}$ , observa-se modificações atribuídas a grupos aldeídos, sendo esses originados a partir da oxidação parcial da hemicelulose (SAKDARONNARONG e JONGLERTJUNYA, 2012). Comportamento semelhante foi observado por que segundo Chen e colaboradores (2014) confirma a remoção da hemicelulose mostrando assim a eficácia do pré-tratamento.

**Figura 26:** Infravermelho do bagaço de sisal *in natura* e pós tratamento ácido.



Fonte –Autor.

Outras bandas do infravermelho são destacadas na literatura, dentre elas, as referentes a celulose e lignina que corroboram os aumentos destes constituintes na biomassa. Na Tabela 8 são descritas as bandas referentes a cada um dos constituintes e o grupo funcional.

**Tabela 8:** Principais modificações no infravermelho do material *in natura* e pós-tratamento

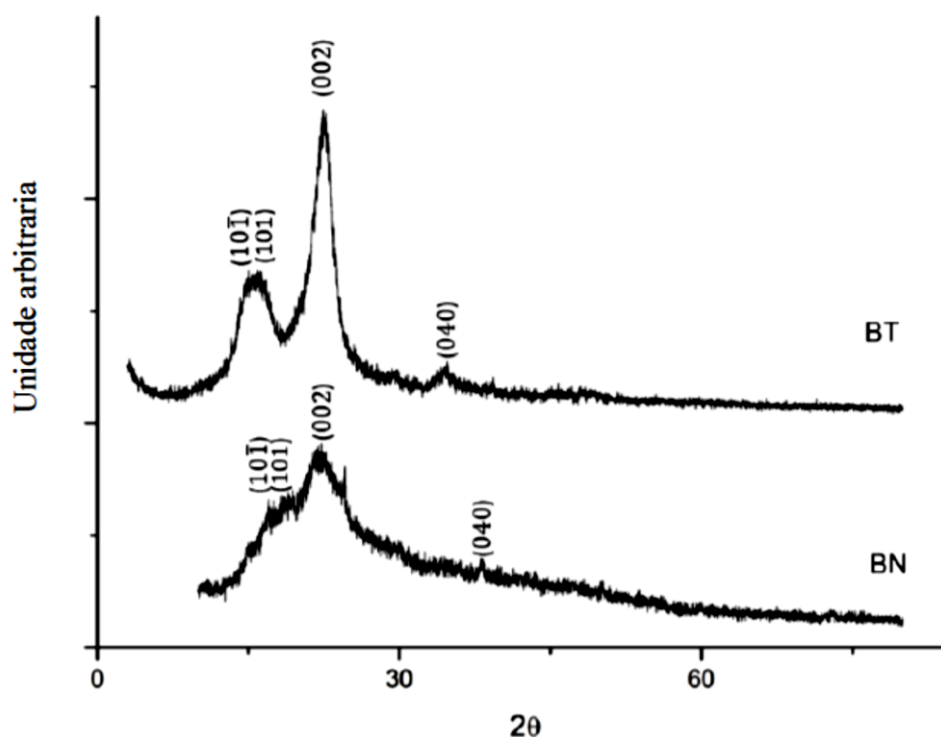
<i>Comprimento de onda (<math>cm^{-1}</math>)</i>	<i>Grupo funcional</i>	<i>Constituinte</i>
875	Estiramento da Ligação glicosídica	Hemicelulose (XU et al, 2013)
990	Estiramento da ligação C-O	Celulose (DEBORA et al, 2011)
1035	Estiramento C-O, C=C e C-C-O	Celulose, lignina e hemicelulose (DEBORA et al, 2011)
1620	Deformação C=O	Derivados hemicelulósicos (SAKDARONNARONG e JONGLERTJUNYA, 2012)
1730	Estiramento da Ligação éster	Derivados hemicelulósicos (SAKDARONNARONG e JONGLERTJUNYA, 2012)
2840 e 2937	Estiramento C-H	Lignina (Kubo e Kadla, 2005)
3421	Estiramento O-H	Lignina (Kubo e Kadla, 2005)

#### 4.3.2 Difração de raios –X

As análises de difração de raios-x corroboram com as de composição do material *in natura* e pós tratamento ácido (GUILHERME et al, 2015). Os picos foram indexados a partir da ficha ICDD 00-060-1502, sendo catalogada como  $\beta$ -celulose. Dentre os constituintes poliméricos do material lignocelulósico, somente a celulose tipo I tem característica cristalina devido a ordenação de monômeros de hexoses (HERNÁNDEZ-MELÉNDEZ et al, 2016). Os outros componentes, lignina e hemicelulose, estão dispersos de forma amorfa na estrutura, onde as suas quantidades interferem diretamente na cristalinidade do material.

No difratograma observou-se o plano de reflexão (002), sendo esse atribuído aos planos de rede dos anéis glicosídicos, característicos da celulose do tipo cristalina (MIRANDA et al, 2015). O aumento na intensidade desse pico após o pré-tratamento ocorreu devido a solubilização de frações amorfas do material lignocelulósico (SINGH et al, 2013), deixando assim a porção cristalina mais exposta.

**Figura 27** - Difração de raios-X do bagaço tratado (BT) e do bagaço *in natura* (BN).



Fonte –Autor.

Os resultados do índice de cristalinidade ratificam o aumento da fração cristalina, de 53,28% da biomassa *in natura* para 77,03% após o tratamento ácido. Esse aumento de 23,75% na cristalinidade se deve a alta exposição da celulose após o pré-tratamento, sendo este o constituinte que mais aumentou o seu teor durante o processo, e a solubilização da hemicelulose. Na Tabela 9 os índices de cristalinidade são comparados nas duas condições com outros materiais submetidos a processos semelhantes.

**Tabela 9:** Comparação do IC do material in natura e pós tratamento de variadas biomassas

Material	IC do material in natura (%)	IC do material tratado (%)	Condições da pré-hidrolise
Bagaço de sisal	53,28	77,03	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> à 2,5%, 110 °C e 60 min
Espigas de milho (NANTAPIPAT et al 2013)	26,94	39,98	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> à 2%, 120 °C e 5 min
Bagaço de cana (CHANDEL et al, 2014)	48,8	58,82	100 mg de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /g de bagaço, 121 °C e 20 min
Bambu (LIU e FEI, 2013)	44,4	49,8	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> à 2%, 180 °C e 40 min

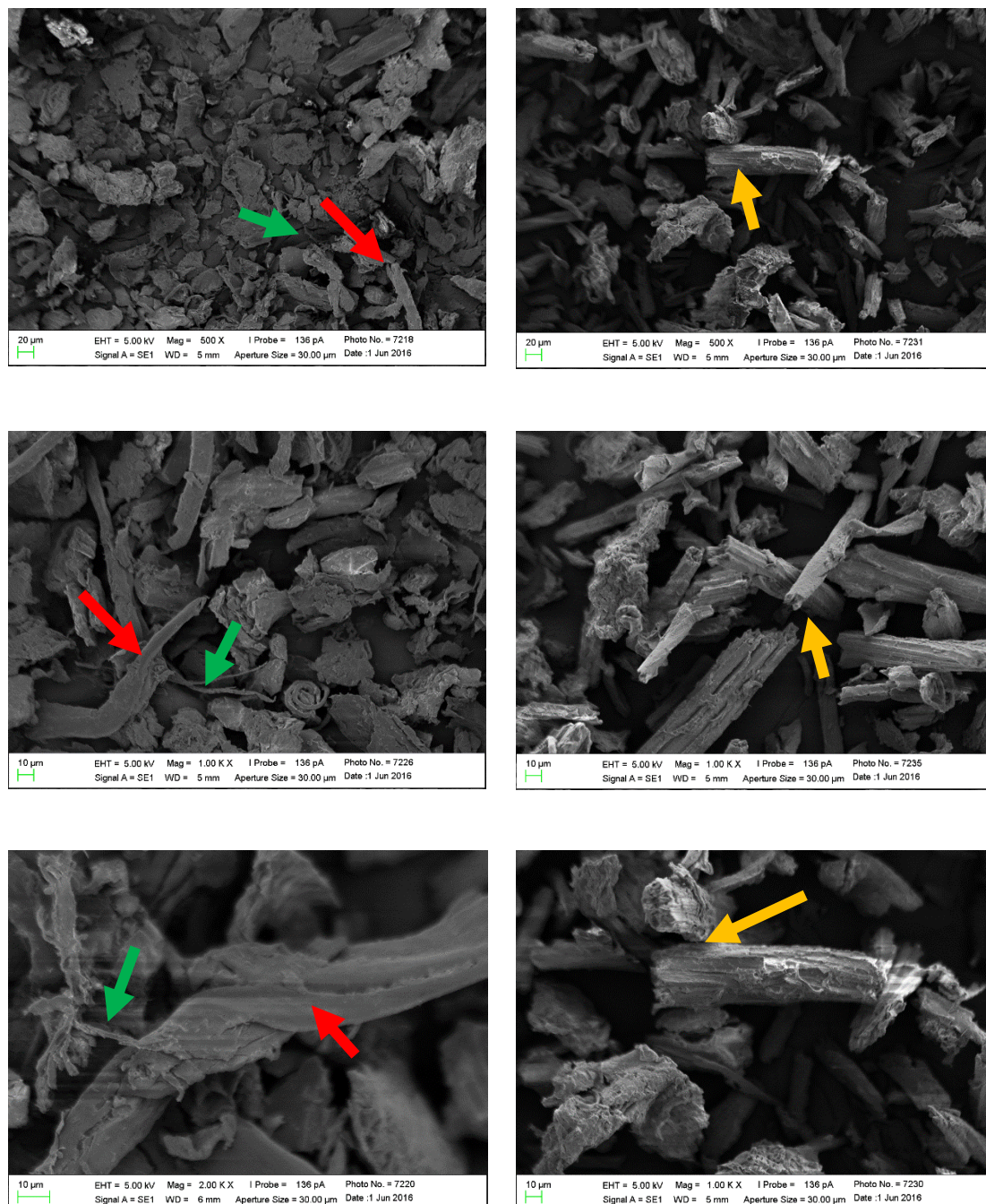
O pré-tratamento no bagaço foi o mais eficiente, removendo grande quantidade da fração amorfa do material, aumentando assim seu índice de cristalinidade. Em todos os pré-tratamentos os teores de ácido foram próximos, divergindo basicamente o tempo reacional e a temperatura. Percebe-se que, o tempo reacional interfere mais efetivamente na pré-hidrolise do que a temperatura, quando se compara o bagaço do sisal com o bambu.

#### 4.3.3 Microscopia eletrônica de varredura

As imagens da microscopia eletrônica do bagaço de sisal in natura e pós tratamento ácido ratificam a mudança estrutural e de composição que ocorre no material lignocelulósico ao realizar o pré tratamento ácido. Na figura 28 percebe-se que após a realização do pré-tratamento as fibrilas que interligam fibras maiores no material in natura desaparecem, ficando essas mais expostas e em grande quantidade. Essas fibrilas são estruturas da hemicelulose que é solubilizada, em parte, após a realização do ataque ácido, deixando a celulose mais exposta e suscetível a hidrolises (ÁVILA-LARA et al, 2015). Percebe-se também a quebra das fibras da celulose em estruturas menores, que justifica o uso do pré-tratamento para obtenção de açúcares fermentáveis. Na Figura 28, observa-se as setas vermelhas representando as fibras de celulose, as verdes a hemicelulose e as em amarelo a celulose rompida pós-tratamento ácido.



**Figura 28** -Micrografias do bagaço de sisal *in natura* (primeira coluna) e pós tratamento ácido (segunda coluna).

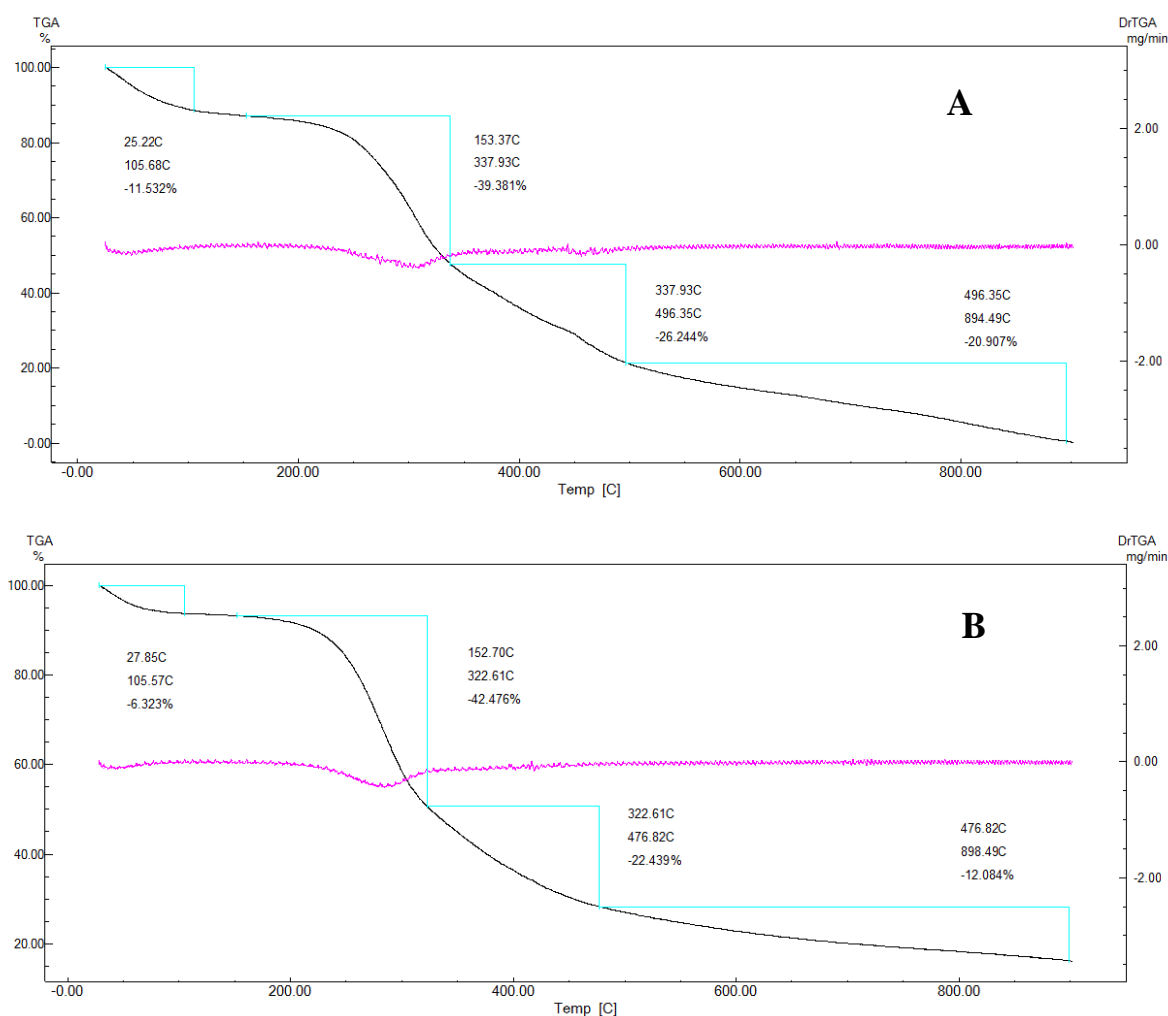


Comportamento descrito por Xiao e colaboradores (2011) foi observado, em que após a realização do tratamento ocorreu aumento da área de superfície da celulose. Sendo assim, a micrografia contribuiu para observar a remoção da fração hemicelulósica com o pré-tratamento ácido, sem danificar a celulose presente no material lignocelulósico.

#### 4.3.4 Estudo Termogravimétrico

A partir das curvas termogravimétricas as perdas de massa do bagaço de sisal in natura e após pré-tratamento ácido (Figura 29) foram determinadas. A primeira etapa de perda de massa ocorreu da temperatura ambiente até 105 °C, referente a desidratação do material. O teor de umidade do bagaço in natura foi maior que o tratado, devido após o pré-tratamento o resíduo foi lavado e seco na estufa. A segunda etapa de perda de massa foi atribuída a despolimerização da hemicelulose e a clivagem de ligações glicosídicas da celulose (AVILA-LARA et al, 2015). A terceira etapa de perda de massa foi atribuída a celulose e a diminuição com o pré-tratamento pode ser atribuída a solubilização da celulose do tipo II. A quarta etapa de perda de massa refere-se à decomposição da lignina, e ocorre também a partir de 200 °C devido a grande variedade de funções e ligações presentes em sua estrutura (AVILA-LARA et al, 2015).

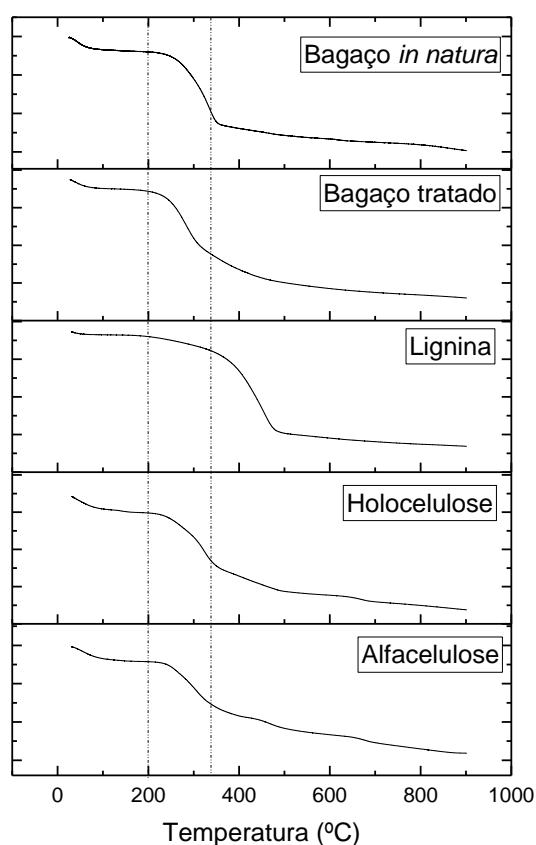
**Figura 29:** A- Curvas TG do bagaço de sisal in natura e B- Após pré-tratamento ácido





A Termogravimetria contribuiu para observar a remoção da hemicelulose do bagaço de sisal. As curvas TG do material lignocelulósico adquirem comportamento semelhante a do componente em maior percentual. Na solubilização da hemicelulose percebe-se uma modificação entre as temperaturas de 200 a 330 °C quando comparadas as curvas termogravimétricas do material in natura e do pré-tratado, ocorrendo pequeno deslocamento da curva do material tratado. Percebe-se que, após o pré-tratamento a curva do bagaço de sisal se assemelha bastante a da alfa-celulose, já que ocorreu aumento considerável deste componente após o pré-tratamento. O aumento do teor de lignina e celulose, juntamente com a remoção da hemicelulose são justificadas pelas curvas TG (Figura 30), porém não foi possível quantificar o percentual de cada componente devido a proximidade nas temperaturas de degradação.

**Figura 30:** Curvas TG do bagaço de sisal antes e após pré-tratamento, e dos constituintes (Lignina, holocelulose e alfa-celulose).

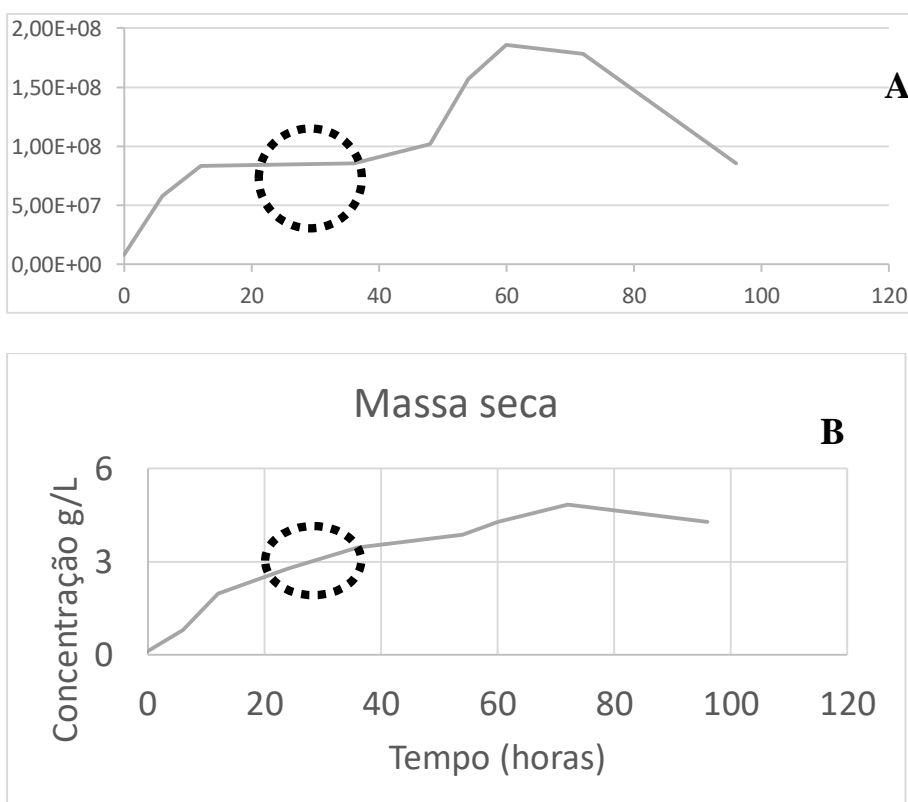


**Fonte – Própria**

#### 4.4 Cinética de crescimento e produção de xilitol e etanol

Antes da utilização do licor hidrolisado, foi realizado o estudo cinético de crescimento do microrganismo para identificar o tempo de pré-inóculo. Utilizou-se dois métodos para quantificar o crescimento: o de massa seca e contagem em câmara de Neubauer. Em ambas as curvas de crescimento no tempo 0 às 16 horas apresentaram característica exponencial, sendo essa fase denominada log. Entre 16 e 48 horas observou-se comportamento constante da curva, sendo essa fase denominada estacionária. Após 48 horas de pré-inóculo o microrganismo aumentou rapidamente e iniciou-se a etapa de morte ou declínio (Figura 31). Esses estágios da levedura também foram descritos por Wang e colaboradores (2011) em seu trabalho. O melhor tempo para a realização do inóculo foi de 24 horas, o qual satisfaz as duas condições ótimas descritas na literatura para fermentação que seria uma quantidade de células acima de  $10^7$  células/mL ou 3 g/L, além das células estarem mais ativas.

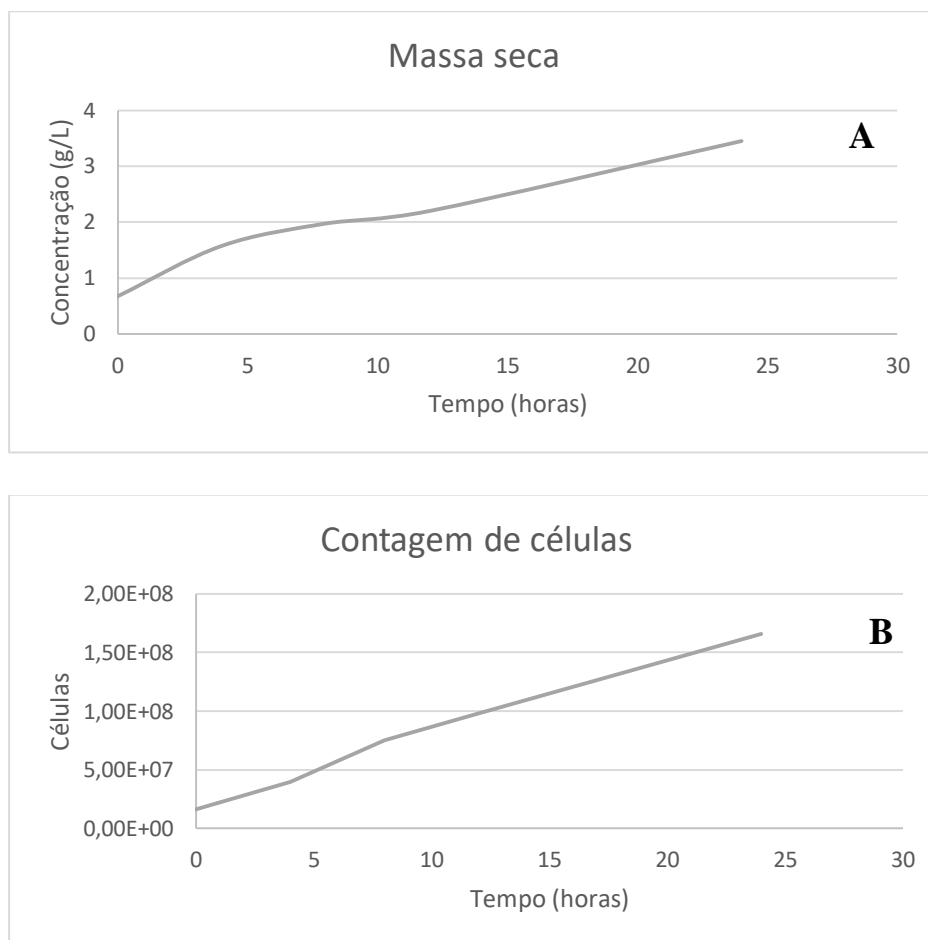
**Figura 31:** Curvas de crescimento por número de células (A) e massa seca (B).



Fonte – Autor.

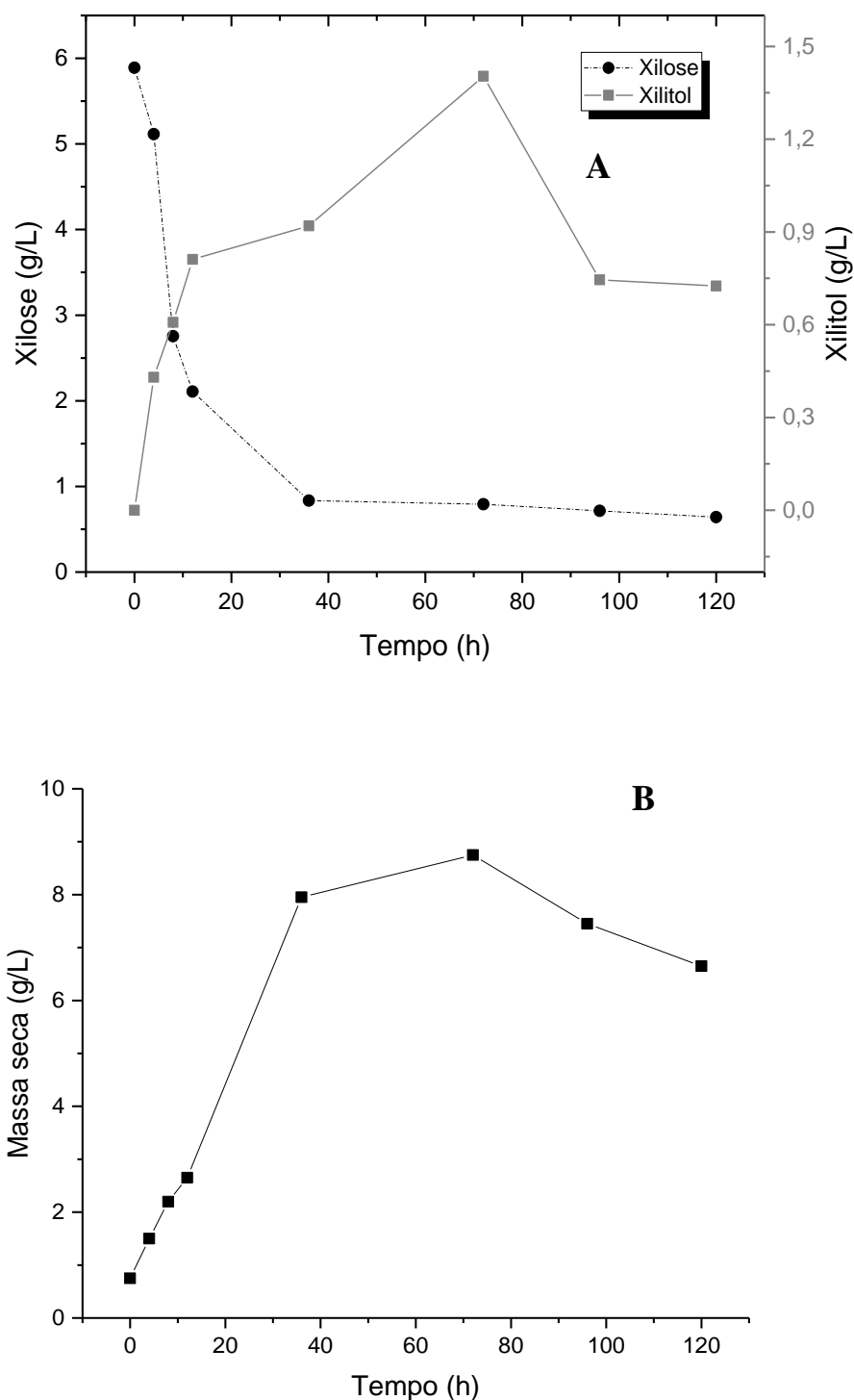
Após o estudo da levedura o pré-inóculo foi feito e verificaram-se as condições para a inserção do microrganismo ao meio. Após 24 horas o meio sintético contém o número de células e a concentração de levedura ótima para uma boa fermentação (Figura 32).

**Figura 32:** Curvas de crescimento por massa seca (A) e número de células (B).



Satisfeitas as duas condições de concentração do meio sintético para um ótimo inóculo iniciou-se a fermentação. Nesse procedimento analisou-se a massa do microrganismo verificando o seu comportamento no licor do sisal, sem nenhum nutriente no meio, que tem a presença de outros açúcares e ácido acético. Não foi possível analisar através da contagem de células devido a coloração escura do meio. Com relação à massa seca no licor original percebeu-se comportamento semelhante ao sintético, no qual inicialmente ocorreu crescimento exponencial da *Cândida guilhermondii* e após 72 horas de fermentação o microrganismo iniciou a fase de morte (Figura 33).

**Figura 33:** A- Consumo de xilose e produção de xilitol; B- Crescimento do microrganismo no licor hemicelulósico.



**Fonte – Autor.**

Na Figura 33A percebe-se o rápido consumo da xilose, em menos de 20 horas mais de 65% da quantidade inicial fermentada já tinha sido metabolizada pela levedura. Os primeiros

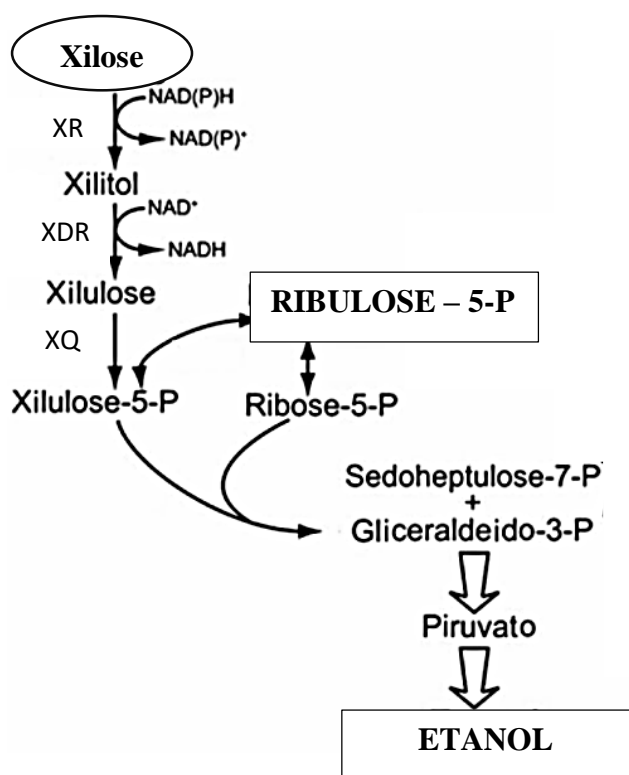
indícios de xilitol começaram a aparecer no tempo de 8 horas, tendo sua concentração máxima após 72 horas de fermentação, rendimento de 0,27 g/g e eficiência de 30,6%, onde esse melhor tempo também foi observado por Sene e colaboradores (2011). Nesse momento a quantidade de xilose restante no meio foi baixa, a qual correspondia a 13% com relação a inicial, fazendo assim com que a produção de xilitol fosse desfavorecida. Segundo Parajó (1998) o metabolismo de xilose em leveduras produz diversos produtos como dióxido de carbono, ácido acético, etanol e xilitol. Os fatores de rendimento em produto são dependentes da regulação do fluxo de carbono através das rotas metabólicas. Dessa forma, quando a concentração de xilose diminui a níveis muito baixos a levedura recorre a outras fontes de carbono, como o ácido acético e o próprio xilitol. Depois do tempo onde a produção de xilitol foi máxima, em 72 h, ocorreu diminuição na sua concentração desse produto. A formação de xilitol a partir da xilose baseia-se no mecanismo de redução onde ocorre a adição de um átomo de hidrogênio na molécula de xilose na presença da coenzima NADH (Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídio). Nessa etapa requer a presença de uma quantidade limitante de oxigênio, denominando assim uma condição semi-aeróbica. Porém, excesso de oxigênio e um aumento na razão  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  contribui para a oxidação do xilitol e formação de xilulose, que posteriormente é convertida em uma pentose fosfato a fim de gerar energia para o metabolismo celular e posteriormente a glicerol e etanol (SOLEIMANI, 2014).

O hidrolisado do bagaço do sisal apresentou consumo de ácido acético no transcorrer da fermentação. Mesmo com teor inicial de 1,6 g/L, dentro dos padrões aceitáveis, o rendimento nessas condições foi de 0,27 g/g e eficiência de 30,6%. Schirmer-Michel (2008) utilizando a *Cândida guilliermondii* no hidrolisado da casca de soja obteve comportamento similar com rendimento de 0,34 g/g, e depois da produção máxima de xilitol ocorreu decréscimo de xilitol no meio, causado pelo acúmulo de inibidores e consumo do próprio xilitol como fonte de carbono.

A obtenção de etanol através da *Cândida guilliermondii* também foi observada por Silva e colaboradores (2014) para o licor hemicelulósico do bagaço de cana de açúcar, o qual desempenha um papel importante inibindo o consumo da glicose do meio fermentativo. Para produção de etanol verificou-se que no tempo de 36 horas de fermentação ocorreu a produção máxima, com 2,37 g/L. Porém como nesse tempo a quantidade de xilose presente no meio já era muito baixa, o microrganismo começou a consumir o etanol como fonte energética (FLORES et al., 2000). Dessa forma não possível gerar a curva da produção de etanol devido durante o processo fermentativo o etanol aparecer em somente dois dos tempos analisados.

Essa quantidade de etanol produzida é próxima a descrita por Sene e colaboradores (2011) para a *Cândida guilliermondii*, onde após 24 horas obteve-se a maior quantidade do álcool (2,8 g/L). O mecanismo de conversão do xilitol a etanol por alguns tipos de *Cândida* é representado a seguir, onde o xilitol é metabolizado pelo xilitol redutase chegando a xilulose. Essa é metabolizada a xilulose-5-P pela xiluloquinase, sendo posteriormente convertida a etanol (Figura 34).

**Figura 34:** Produção do etanol a partir da xilose. XR – xilosereducutase; XDR – xilitol desidrogenase; XQ - xiluloquinase.



Fonte – Adaptado de (WOHLBACH et al., 2011)

Não foi possível determinar o rendimento nem a eficiência da produção do etanol devido o mesmo ser um subproduto gerado a partir do xilitol. Esse tipo de *Cândida* é mais convencionalmente utilizada para produção única de xilitol, porém como essa cepa se comportou dessa forma a eficiência e o rendimento do xilitol foi afetada, já que uma parte do que era produzido foi simultaneamente convertido a etanol.

A produção de etanol a partir da xilose mostra-se promissora, já que esse açúcar é o segundo carboidrato mais abundante na natureza, surgindo assim como uma fonte alternativa

de combustível para o futuro (JEFFRIES, 2006). Esse procedimento de obtenção de etanol da fração hemicelulósica devido a utilização de condições moderadas, tanto de temperatura quanto de concentrações de reagentes, tornando-o promissor na produção de bioetanol (SWAIN et al, 2015).

# CONCLUSÃO

---



## 5. CONCLUSÃO

O tratamento com ácido sulfúrico diluído foi eficiente, pois utilizou baixas concentrações de ácido e temperaturas brandas, removeu parte da hemicelulose e gerou 6,2 g/L de xilose no licor. A análise estatística indicou que a condição de maior teor de ácido e maior temperatura ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  2,5 % e 120 °C) foi a mais adequada para a extração da fração hemicelulósica do bagaço de sisal. O modelo foi estatisticamente significativo e linear, com grau de confiança de 95% e razão entre o  $F_{\text{calculado}}$  e o  $F_{\text{tabelado}}$  maior que 1.

A eficiência do pré-tratamento foi confirmada por técnicas espectroscópicas, de difração e térmicas. Os espectros de absorção na região do infravermelho antes e depois do pré-tratamento indicaram modificações das bandas nas regiões de comprimento de onda 1730, 1630 e 870  $\text{cm}^{-1}$ , sendo estas atribuídas a hemicelulose. Nos difratogramas verificou-se o aumento da cristalinidade do material, com a remoção da hemicelulose e aumento da celulose tipo 1, além do aumento no índice de cristalinidade de 23,75%. As análises de microscopia eletrônica de varredura demonstraram a eficiência do tratamento com ácido sulfúrico diluído, removendo as fibrilas da hemicelulose e quebrando as ligações da celulose em porções menores. As curvas termogravimétricas de cada componente lignocelulósico indicaram que o bagaço de sisal tratado assumiu comportamento semelhante ao da celulose, já que era o componente majoritário na amostra.

No processo fermentativo os melhores tempos de inoculo foram entre 24 e 36 h, e durante a fermentação obteve-se as maiores concentrações de xilitol em 72 horas e de etanol em 36 horas, produzindo respectivamente 1,4 g/L e 2,4 g/L com *Cândida guilliermondii* tendo um rendimento satisfatório para um meio sem adição nutrientes.

## REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, T. L., SILVA JR., I. J., MACEDO, G. R., ROCHA, M. V. P.; Biotechnological production of xylitol from lignocellulosic wastes: A review. *Process Biochemistry* 49. 1779–1789. (2014)

ASADA, C., BASNET, S., OTSUKA, M., SASAKI, C. NAKAMURA, Y.; Epoxy resin synthesis using low molecular weight lignin separated from various lignocellulosic materials. *International Journal of Biological Macromolecules*. 74, 413–419. (2015)

ÁVILA-LARA, A. I.; CAMBEROS-FLORES, J. N.; MENDOZA-PÉREZ, J. A.; MESSINA-FERNÁNDEZ, S. R.; SALDAÑA-DURAN, C. E.; JIMENEZ-RUIZ, E. I.; SÁNCHEZ-HERRERA, L. M.; E PÉREZ-PIMIENTA, J. A. ; Optimization of alkaline and dilute acid pretreatment of agave bagasse by response surface methodology ; *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*; Vol 3 (146) ; (2015)

AYENI, A. O.; ADEEYO, O. A.; ORESEGUN, O. M.; OLADIMEJI , T. E.; Compositional analysis of lignocellulosic materials: Evaluation of an economically viable method suitable for woody and non-woody biomass - *American Journal of Engineering Research (AJER)* Vol4, Is-4, pp-14-19 (2015)

BARBOSA, L. C. A.; MALTHA, C. R. A.; SILVA, V. L.; Determinação da relação siringila/guaiacilada lignina em madeiras de eucalipto por pirólise acoplada à cromatografia gasosa e espectrometria de massas (pi-cg/em) - *Quim. Nova*, Vol. 31, No. 8, 2035-2041, (2008).

BENTO, C. B. P.; CASARIL, K. B. P. B.; Bioconversão de resíduos agroindustriais lignocelulósicos por fungos causadores da podridão branca: uma alternativa à produção de alimentos – revista faz ciência – Volume 14 – Número 19– pp. 151-180. (2012)

BEZAZI, A., BELAADI, A., BOURCHAK, M., SCARPA, F., BOBA, K.; Novel extraction techniques, chemical and mechanical characterization of *Agave Americana* L. natural fibres. *Composites: Part B* 66, 194–203. (2014)

BOUDET, A. M.; KAJITA, S.; GRIMA-PETTENATI, J.; E GOFFNER D. - Lignins and lignocellulosics: a better control of synthesis for new and improved uses - *TRENDS in Plant Science* Vol.8 No.12 – (2003)

CAMARGO, D.; SENE, L.; - Production of ethanol from the hemicellulosic fraction of sunflower meal biomass - *Biomass Conv. Bioref.* Volume 4, Issue 2, pp 87-93 – (2014)

CANDIDO, R.G.; GODOY, G.G.; GONÇALVES, A.R. ; Study of Sugarcane Bagasse Pretreatment with Sulfuric Acid as a Step of Cellulose Obtaining ; *World Academy of Science, Engineering and Technology International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering* Vol:6, No:1 , P 101, (2012)

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A M. F. - Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira - *Quim. Nova*, Vol. 32, No. 8, 2191-2195, (2009).

CHANDEL, A K; ANTUNES, F.A.F.; ANJOS, V; BELL, M JV; RODRIGUES, L N; POLIKARPOV, I; DE AZEVEDO, E R; BERNARDINELLI, O D; ROSA, C A; PAGNOCCA F C; DA SILVA, S S ; Multi-scale structural and chemical analysis of sugarcane bagasse in the process of sequential acid–base pretreatment and ethanol production by *Scheffersomyces shehatae* and *Saccharomyces cerevisiae* - *Chandel et al. Biotechnology for Biofuels* 16;7:63 ; (2014)

doi: 10.1186/1754-6834-7-63

CHEN, H.; Biotechnology of lignocellulose: theory and practice ; Chemical Industry Press, Beijing and Springer Science Business Media Dordrecht (2014).

DOI 10.1007/978-94-007-6898-7\_\_2

CHEN, S.; WANG, Z.; FANG, K.; FAN, G.; WANG, P.; SONG, J. ; Impact of Dilute Sulfuric Acid Pretreatment on Fermentable Sugars and Structure of Bamboo for Bioethanol Production – BioResources ;Vol 9, No 4 (2014)

EMBRAPA, Procedimentos para análise lignocelulósica. Documentos 236, ISSN 0103 – 0205. (2010)

FILHO, W. B. N.; FRANCO, C. R. - Avaliação do Potencial dos Resíduos Produzidos Através do Processamento Agroindustrial no Brasil - Rev. Virtual Quim. 7 (6), 1968-1987. (2015)

FLORES, C-L; RODRÍGUES,C.; PETIT, T.; GANCEDO, C. ; Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts - FEMS Microbiology Reviews 24 ; 507^529 ; (2000)

GIRISUTA, B.; DUSSAN, K.; HAVERTY, D.; LEAHY, J.J.; HAYES, M.H.B. ; A kinetic study of acid catalysed hydrolysis of sugar cane bagasse to levulinic acid - Chemical Engineering Journal 217 : 61–70 (2013)

GRASSE ;FoodIngredients Brasil Nº 22 – 2012 – disponível em :[www.revista-fi.com](http://www.revista-fi.com). acesso (2016)

GROFF, D.; BENKE, P. I.; BATTH, T. S.; BOKINSKY, G.; PETZOLD, C. J.; ADAMS, P. D.; KEASLING, J. D. - Supplementation of Intracellular XylR Leads to Coutilization of

Hemicellulose Sugars - Applied and Environmental Microbiology :78(7): p. 2221–2229 ; (2012).

GUILHERME, A. A.; DANTAS, P.V.F.; SANTOS, E. S.; FERNANDES, F. A. N.; E MACEDO, G. R. ; Evaluation of composition, characterization and enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse - Brazilian Journal of Chemical Engineering - Vol. 32, No. 01, pp. 23 – 33 ; (2015)

HEINZE, T.; - Cellulose: Structure and Properties – AdvPolymSci , Springer International Publishing Switzerland - 271: 1–52 –(2015).

DOI: 10.1007/12\_2015\_319

HERNÁNDEZ-MELÉNDEZ, O.; MIGUEL-CRUZ, F.; MONTIEL, C.; HERNÁNDEZ-LUNA, M.; VIVALDO-LIMA, E.; MENA-BRITO, C.; BÁRZANA, E. ; Characterization of Blue Agave Bagasse (BAB) as Raw Material for Bioethanol Production Processes by Gravimetric, Thermal, Chromatographic, X-ray Diffraction, Microscopy, and Laser Light Scattering Techniques - Bioenerg. Res. ;pp 1–13; (2016)

doi:10.1007/s12155-016-9760-0

IBRAHEEM,O.; NDIMBA, B. K.- Molecular Adaptation Mechanisms Employed by Ethanologenic Bacteria in Response to Lignocellulose-derived Inhibitory Compounds - Int J BiolSci; 9(6):598-612. (2013).

IBGE; Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/> acesso: (2016).

JEFFRIES, T. W. ; Engineering yeasts for xylose metabolism ; Current Opinion in Biotechnology 17:320–326 (2006)

KUBO, S.; E KADLA, J. F.; - Hydrogen Bonding in Lignin: A Fourier Transform Infrared Model Compound Study ;Biomacromolecules, 6, 2815-2821 (2005).

LACERDA, T. M.; ZAMBON, M. D.; FROLLINI, E.; Effect of acid concentration and pulp properties on hydrolysis reactions of mercerized sisal; Carbohydrate Polymers 93 ; 347–356(2013).

LIMA, F. C. S. Produção de xilitol utilizando licor da pré-hidrólise ácido do bagaço do pêndulo do caju. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos). Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, 2013.

LIU, Z.; FEI, B. - Characteristics of Moso Bamboo with Chemical Pretreatment - book edited by Anuj K. Chandel and Silvio Silvério da Silva, ISBN 978-953-51-1119-1, Published: May 15, 2013 DOI: 10.5772/55379

MARAVÉ, A. G., SALVACHÚA, D., MARTÍNEZ, M.J., DIAZ, L.F., ZAMORANO, M.; Analysis of the relation between the cellulose, hemicellulose and lignin content and the thermal behavior of residual biomass from olive trees. Waste Management. 33, 2245–2249. 2013.

Mendonça, J. O.; Andrade, R. ; Brandão, W. ; Situação atual do sisal na Bahia e suas novas possibilidades de utilização e aproveitamento ; Revista Bahia Agrícola, v.9, n.1, (2011)

MESA, L.; GONZÁLEZ, E.; CARA, C.; RUIZ, E.; CASTRO, E.; E MUSSATTO, S. I. ; An approach to optimization of enzymatic hydrolysis from sugarcane bagasse based on organosolv pretreatment - J Chem Technol Biotechnol; 85: 1092–1098 ; (2010)

MIRANDA, C. S.; FIUZA, R. P.; CARVALHO, R. F.; JOSÉ, N. M. ; Efeito dos tratamentos superficiais nas propriedades do bagaço da fibra de piaçava ; *AttaleafuniferaMartius - Quim. Nova*, Vol. 38, No. 2, 161-165, (2015)

MORAIS, A.; PINTO, J.; NUNES, D.; ROSEIRO, L. B.; OLIVEIRA, M. C.; FORTUNATO, E.; E BOGEL-LUKASIK, R.; Imidazole – prospect solvent for lignocellulosic biomass fractionation and lignification - *ACS Sustainable Chem. Eng.*, 4 (3), pp 1643–1652 – (2016)

MORAIS, J. P. S.; ROSA, M. DE F.; FILHO, M. DE S.; NASCIMENTO, L. D.; DO NASCIMENTO, D. M.; CASSALES, A. R. ; Extraction and characterization of nanocellulose structures from raw cotton Linter – *Carbohydrate Polymers* 91 ; 229– 235 ; (2013).

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. ; Xilitol: Edulcorante com efeitos benéficos para a saúde humana - *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* vol. 38, n. 4, (2002).

NANTAPIPAT, J.; LUENGNARUEMITCHAI, A.; E WONGKASEMJIT, S. ; A Comparison of Dilute Sulfuric and Phosphoric Acid Pretreatments in Biofuel Production from Corn cobs - *World Academy of Science, Engineering and Technology International Journal of Chemical, Molecular, Nuclear, Materials and Metallurgical Engineering* Vol:7, No:4, (2013)

NAVARRO, R. M. S.; NAVARRO, F. M. S.; TAMBOURGI, E. B. - Estudo de diferentes processos de obtenção da pasta celulósica para fabricação de papel - *Revista Ciências & Tecnologia* - Ano 1 , n. 1, P: 1-5 – (2007).

NUNES, R. DE M.; GUARDA, E. A.; SERRA, J. C. V.; MARTINS, A. A. ; Resíduos agroindustriais: potencial de produção do etanol de segunda geração no Brasil. *Revista Liberato, Novo Hamburgo*, v. 14, n. 22, p. 113-238, (2013)

OGEDA ,T. L.; PETRI , D. F. S. ; Hidrólise Enzimática De Biomassa - Quim. Nova, Vol. 33, No. 7, 1549-1558, (2010)

PARAJÓ, J.C.; DOMINGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J.M. ;Biotechnological production of xylitol. part 1: interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. Bioresource Technology 65 ; 191-2111 ; (1998)

PEREIRA, S. C.; MAEHARA, L.; MACHADO, C.M.M.; E FARINAS, C. S. ; 2G ethanol from the whole sugarcane lignocellulosic biomass -Biotechnology for Biofuels 12 - 8:44 - (2015).

DOI 10.1186/s13068-015-0224-0

REN, N-Q., ZHAO, L., CHEN, C., GUO, W-Q., CAO, G-L., A review on bioconversion of lignocellulosic biomass to H : Key challenges and new insights ; Bioresource Technology Vol 215, Pages 92–99 (2016).

RFA – Renewable Fuels Association – Disponível em: <http://old.ethanolrfa.org/pages/how-ethanol-is-made>. Acesso em: (2016)

ROSA, M. F.; SOUZA FILHO, M S. M.; FIGUEIREDO, M. C. B.; MORAIS, J. P. S.; SANTAELLA, S.T., LEITÃO, R.C. - Valorização de resíduos da agroindústria - II Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais – II SIGERA 15 a 17 de março de 2011 - Foz do Iguaçu, PR - Volume I – Palestras.(2011)

ROSE, M.; BABI, M.; MORAN-MIRABAL, J. - The Study of Cellulose Structure and Depolymerization Through Single-Molecule Methods - INDUSTRIAL BIOTECHNOLOGY, INC. \_ VOL. 11 NO. 1 , p 16-24 , (2015).



SANTOS, J. D. G.; VIEIRA, I. J. C.; BRAZ-FILHO R.; E BRANCO, A.;– Chemicals from Agave sisalana Biomass: Isolation and Identification –International Journal of Molecular Sciences Int. J. Mol. Sci. 16, 8761-8771–(2015).

SAKDARONNARONG, C.; JONGLERTJUNYA, W. - Rice straw and sugarcane bagasse degradation mimicking lignocellulose decay in nature: An alternative approach to biorefinery ;ScienceAsia 38 (2012): 364–372

SARROUH, B.; E DA SILVA, S. S. ; Repeated Batch Cell-Immobilized System for the Biotechnological Production of Xylitol as a Renewable Green Sweetener – Appl Biochem Biotechnol Vol 169, Is 7, :2101–2110 - (2013).

SCHIRMER-MICHEL, A.C.; FLORES, S.H.; HERTZ, P.F.; MATOS, G.S.; Ayub, M.A.Z. ; Production of ethanol from soy bean hull hydrolysate by osmotolerant *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075. Bioresource Technology 99 ; 2898–2904 ; (2008)

SCHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. – Hemicelluloses - Annu. Rev. Plant Biol. 61: 263–89- (2010).

SENE, L.; ARRUDA, P.V.; OLIVEIRA, S.M.M.; FELIPE, M.G.A. ; Evaluation of sorghum straw hemicellulosic hydrolysate for biotechnological production of xylitol by *Candida guilliermondii* - Brazilian Journal of Microbiology 42: 1141-1146 ; (2011)

SILVA, D. D. V.; CÂNDIDO, E. DE J.; ARRUDA, P. V. DE; SILVA, S. S. DA; FELIPE M. DAS G. DE A.; New culture medium for bioconversion of C5 fraction from sugarcane bagasse using rice bran extract ; Brazilian Journal of Microbiology 45, 4, 1469-1475 (2014)

SINGH, R.; TIWARI, S.; SRIVASTAVA, M.; SHUKLA, A.; - Performance study of combined microwave and acid pretreatment method for enhancing enzymatic digestibility of rice straw for bioethanol production - *Plant Knowledge Journal* 2(4):157-162 (2013)

SOLEIMANI, M.; Tabil, L.; Evaluation of biocomposite-based supports for immobilized-cell xylitol production compared with a free-cell system. *Biochemical Engineering Journal* 82 ; 166–173 ; (2014)

SOUSA, C. A. B. DE; DA SILVA, F. L. H.; CONRADO, L. DE S. ;Lixiviação de poligalacturonases obtidas pela fermentação semissólida da casca e albedo do maracujá-amarelo - *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* v.16, n.7, p.790–794, 2012.

SUHAS, V.K.; GUPTA, P.J.M.; CARROTT, R. S.; CHAUDHARY, M.; e KUSHWAHA, S.; Cellulose: A review as natural, modified and activated carbon adsorbent - *Bioresource Technology* - V 216, P 1066–1076, 2016

SWAIN, M. R.; KRISHNAN, c ; Improved conversion of rice straw to ethanol and xylitol by combination of moderate temperature ammonia pretreatment and sequential fermentation using *Candida tropicalis* ; *Industrial Crops and Products* 77 ; 1039–1046 ; (2015)

TOCHAMPA, W.; SIRISANSANEYAKUL, S.; VANICHSRIRATANA, W.; SRINOPHAKUN, P.; BAKKER, H. H. C.; CHISTI, Y.; A model of xylitol production by the yeast *Candida mogii* - *Bioprocess Biosyst Eng* 28 (3): 175–183 (2005).

VANDEBOSSCHE, V.; BRAULT, J.; VILAREM, G.; HERNÁNDEZ-MELÉNDEZ, O.; VIVALDO-LIMA, E.; HERNÁNDEZ-LUNA, M.; BARZANA, E.; DUQUE, A.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, M.; MATA, J.; CASTELLÓN, E.; RIGAL, L. ; A new lignocellulosic biomass deconstruction process combining thermo-mechano chemical action

and bio-catalytic enzymatic hydrolysis in a twin-screw extruder - *Industrial Crops and Products* 55 ; 258–266 ; (2014).

XIAO, L-P; SUN, Z.; SHI, Z-J; XU, F.; SUN, R-C.; - Impact of hot compressed water pretreatment on the structural changes of woody biomass for bioethanol production – *BioResources* Vol 6, No 2 (2011)

XU, F.; YU, J.; TESSO, T.; DOWELL, F.; E WANG, D., "Qualitative and quantitative analysis of lignocellulosic biomass using infrared techniques: A mini-review". *Applied Energy* 104 ; 801–809 ; (2013)

WATKINS, D.; NURUDDIN, MD.; HOSUR, M; TCHERBI-NARTEH, A.; JEELANI, S. ; Extraction and characterization of lignin from different biomass resources - *j mater res technol* . ;4 (1) :26–32 ; (2015).

WEINWURM, F.; DRLJO, A.; WALDMÜLLER, W.; FIALA, B.; NIEDERMAYER, J.; FRIEDL, A. ; Lignin concentration and fractionation from ethanol organosolv liquors by ultra- and nanofiltration - *Journal of Cleaner Production* xxx - 1e10 - (2016).

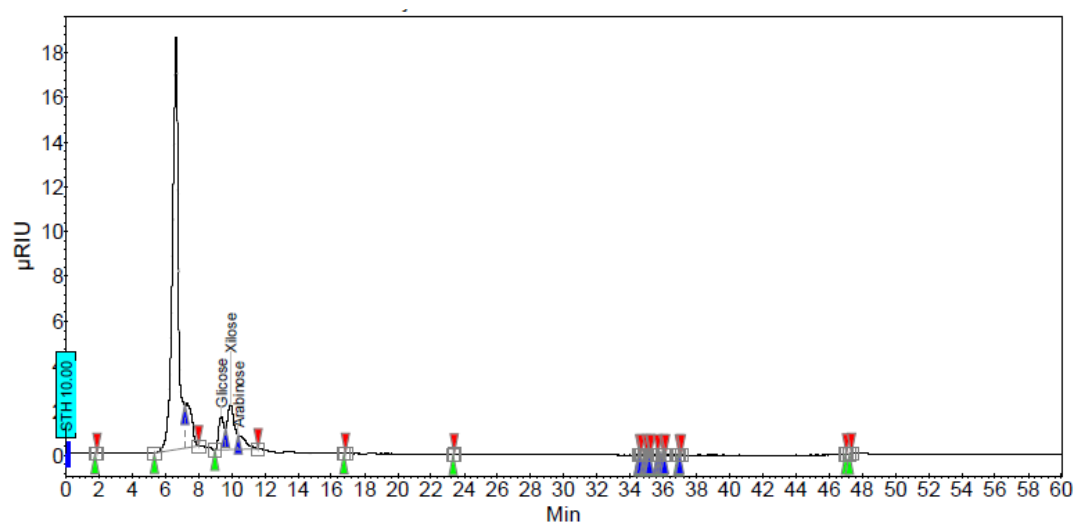
WAGHMARE, P.R., KADAM, A.A., SARATALE, G.D., GOVINDWAR, S.P.; Enzymatic hydrolysis and characterization of waste lignocellulosic biomass produced after dye bioremediation under solid state fermentation. *Bioresource Technology*. 168, 136–141. (2014).

WANG, H.; CHENG, H.; WEI, D. ; WANG, F. ; Comparison of methods for measuring viable *E. coli* cells during cultivation: Great differences in the early and late exponential growth phases; *Journal of Microbiological Methods* 84 (2011) 140–143

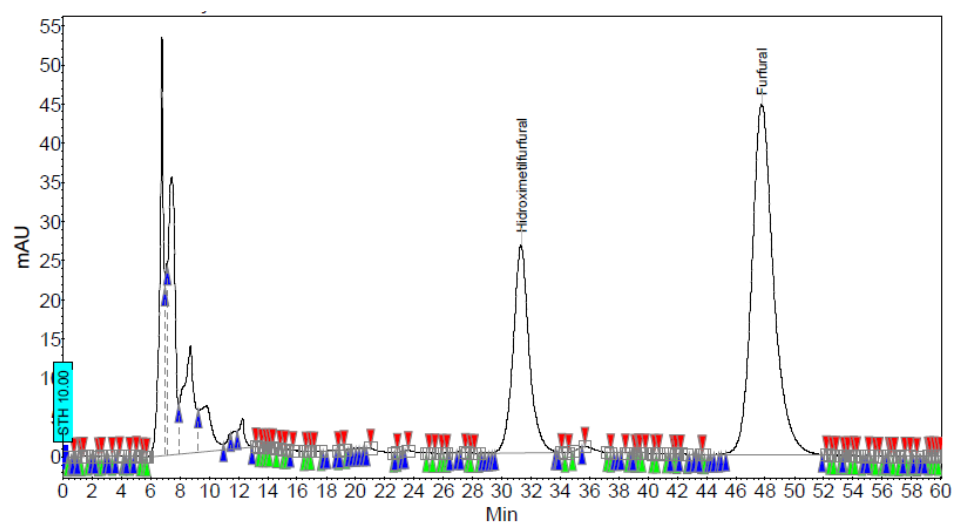
WOHLBACH, D. J.; KUO, A.; SATO, T. K.; POTTS, K. M.; SALAMOV, A. A.; LABUTTI, K. M.; SUN, H.; CLUM, A.; PANGILINAN, J. L.; LINDQUIST, E. A.; LUCAS, S.; LAPIDUS, A.; JIN, M.; GUNAWAN, C.; BALAND, V.; DALE, B. E.; JEFFRIES, T. W.; ZINKEL, R.; BARRY, K. W.; GRIGORIEV, I. V.; GASCH, A. P.; Comparative genomics of xylose-fermenting fungi for enhanced biofuel production - PNAS ; vol. 108 ; no. 32 (2011)

## Apêndice

Cromatograma da melhor condição do planejamento experimental

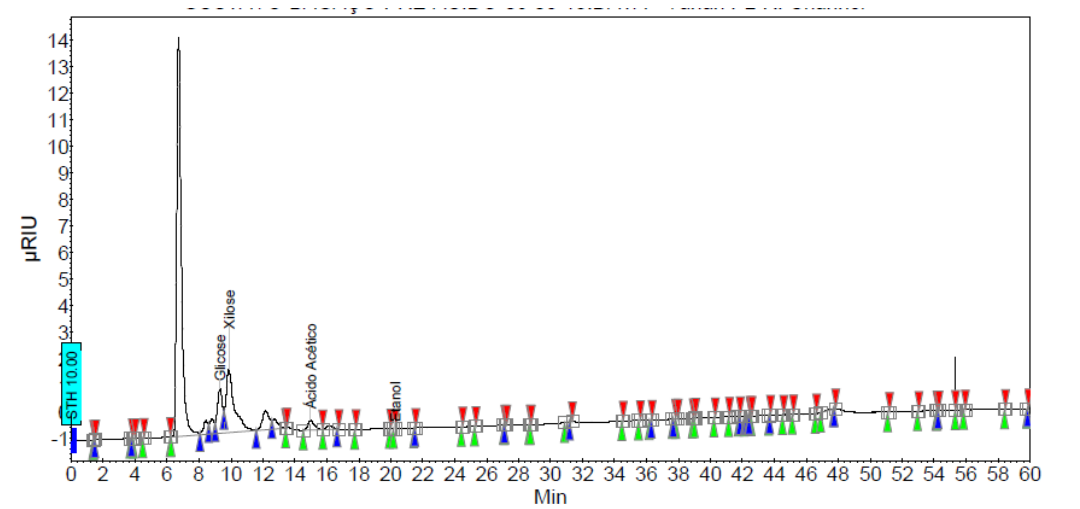


Index	Name	Time [Min]	Quantity [mg/L]	Height [μRIU]	Area [μRIU.Min]	Area % [%]
4	Glucose	9.36	3370.62	1.5	0.6	5.268
5	Xilose	9.91	6243.53	2.0	1.0	9.719
36	Arabinose	10.38	1635.16	0.6	0.3	3.074
Total			11249.31	24.8	10.7	100.000

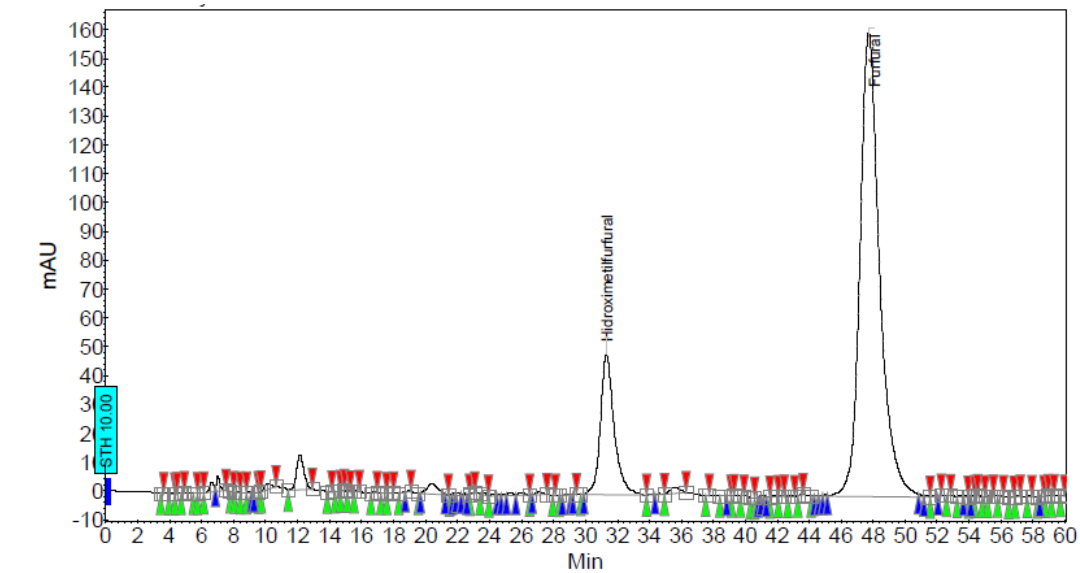


Index	Name	Area [mAU.Min]	Quantity [mg/L]	RF	Resp.
1	HMF	33.3	237.54	7.128	33.33
2	Furfural	77.2	570.85	7.394	77.21
Total		110.5	808.39		110.53

Cromatograma do licor produzido em grande quantidade

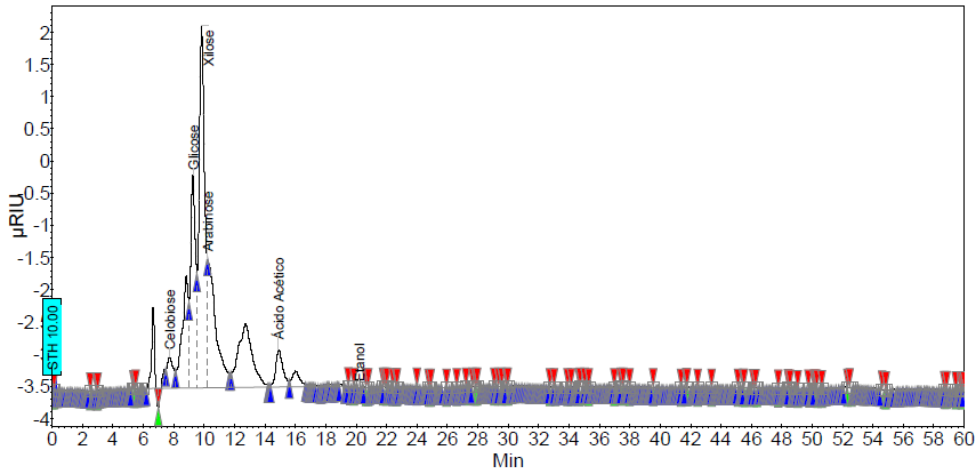


Index	Name	Time [Min]	Quantity [mg/L]	Height [μRIU]	Area [μRIU.Min]	Area % [%]
12	Glucose	9.29	3757.37	1.7	0.6	7.457
13	Xilose	9.86	8796.12	2.4	1.5	17.389
17	Ácido Acético	14.98	2222.15	0.4	0.2	2.046
22	Etanol	20.24	5.89	0.0	0.0	0.003
Total			14781.53	24.1	8.4	100.000

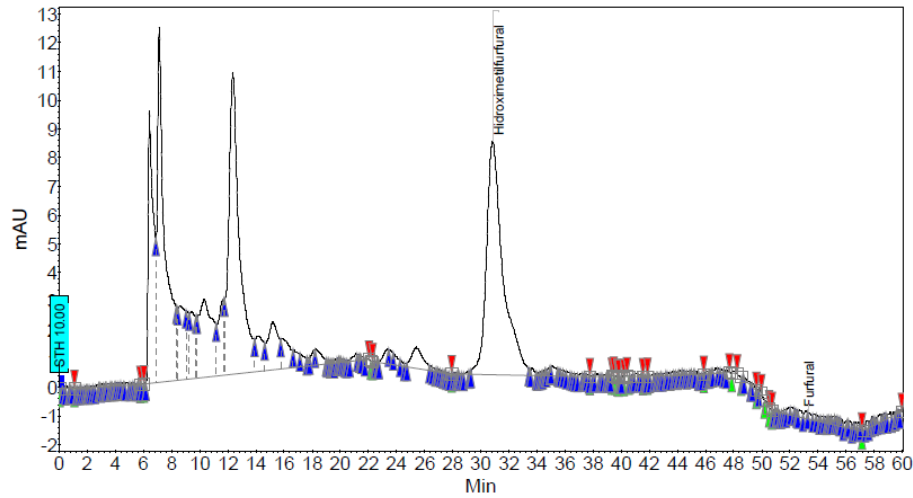


Index	Name	Area [mAU.Min]	Quantity [mg/L]	RF	Resp.
1	HMF	48.8	347.59	7.128	48.77
2	Furfural	229.8	1699.00	7.394	229.79
Total		278.6	2046.59		278.56

Cromatograma no início da fermentação

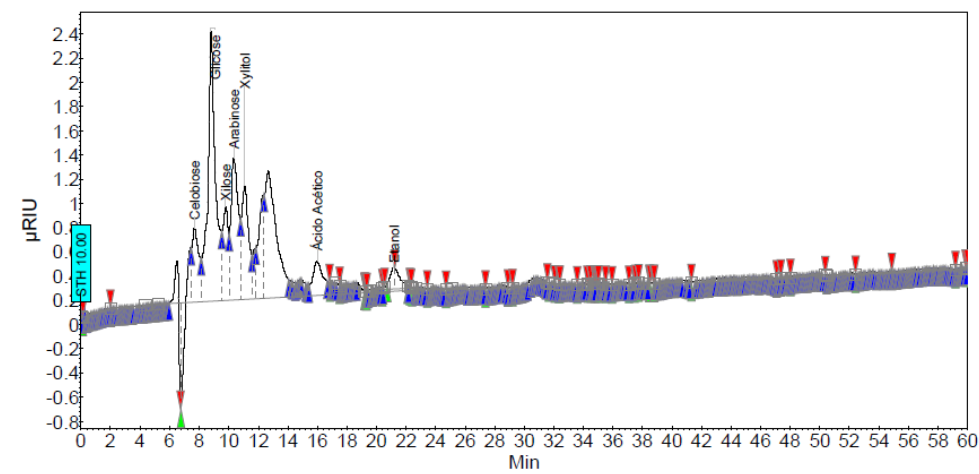


Index	Name	Time [Min]	Quantity [mg/L]	Height [μRIU]	Area [μRIU.Min]	Area % [%]
88	Celobiose	7.71	370.35	0.5	0.2	2.815
89	UNKNOWN	8.82	0.00	1.8	0.8	10.191
90	Glicose	9.25	3010.64	3.3	1.3	15.155
91	Xilose	9.82	5889.39	5.6	2.4	29.529
670	Arabinose	10.21	2570.88	2.0	1.3	15.568
97	Ácido Acético	14.88	1673.81	0.6	0.3	3.909

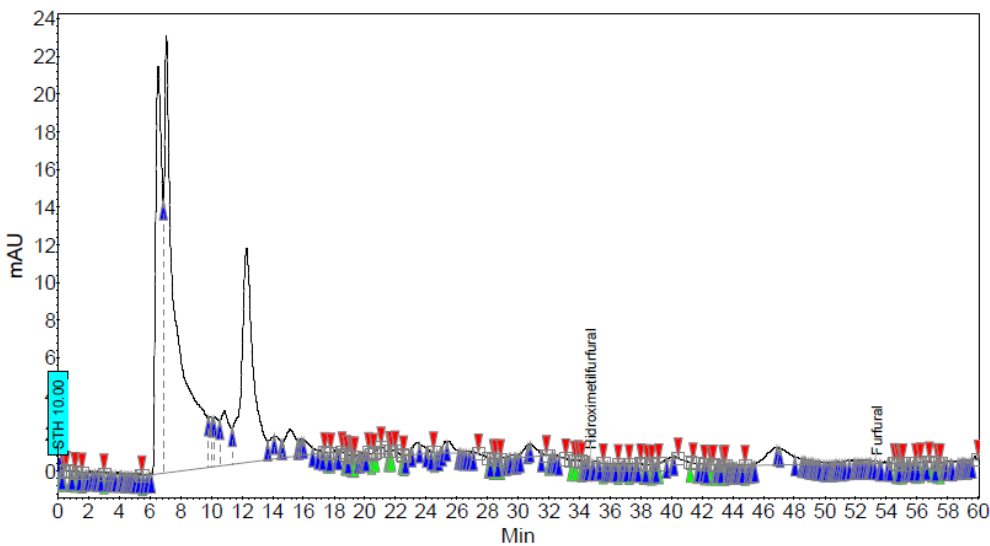


Index	Name	Area [mAU.Min]	Quantity [mg/L]	RF	Resp.
1	HMF	11.0	31.44	2.851	11.03
2	Furfural	0.1	0.20	2.957	0.07
Total		11.1	31.64		11.10

Cromatograma da fermentação no tempo de 72 horas



Index	Name	Time [Min]	Quantity [mg/L]	Height [µRIU]	Area [µRIU.Min]	Area % [%]
83	UNKNOWN	6.75	0.00	0.9	0.0	0.057
84	UNKNOWN	6.75	0.00	0.9	0.0	0.879
85	Celobiose	7.68	506.07	0.6	0.3	5.616
86	Glicose	8.80	3285.14	2.2	1.4	24.141
87	Xilose	9.78	791.92	0.8	0.3	5.796
88	Arabinose	10.34	1342.98	1.2	0.7	11.872
89	Xylitol	11.07	1403.73	0.9	0.5	9.457
106	Ácido Acético	15.97	1146.81	0.3	0.2	3.910
151	Etanol	21.17	482.13	0.2	0.1	1.045



Index	Name	Area [mAU.Min]	Quantity [mg/L]	RF	Resp.
1	HMF	0.0	0.05	2.851	0.02
2	Furfural	0.0	0.10	2.957	0.03
Total		0.1	0.15		0.05